

**ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)**

**VIII ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ»**

**Школа-конференция молодых ученых,
аспирантов и студентов
«Генетические технологии в микробиологии
и микробное разнообразие»**

*Посвящается памяти выдающегося ученого-микробиолога
Льва Владимировича Калакуцкого*

6-8 декабря 2022 г.

Сборник материалов конференций

Москва
ГЕОС
2022

УДК 579.2
ББК 28.4

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

VIII Пушкинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. М.: ГЕОС, 2022. 294 с.

ISBN 978-5-89118-859-4

Сборник включает расширенные тезисы устных и постерных сообщений ведущих специалистов-микробиологов и начинающих исследователей по материалам работ, выполненных в научных учреждениях и университетах страны.

Материалы сообщений охватывают широкий спектр направлений исследований современной микробиологии – стремительно развивающейся области науки, неразрывно связанной с развитием и использованием генетических технологий и методов биоинформатики. В сборнике представлены результаты исследований микробного разнообразия на разных уровнях (организменном, структурном, геномном, функциональном) и методы его сохранения в коллекциях культур, обсуждаются тенденции развития систематики микроорганизмов в постгеномную эру, актуальные вопросы экологии и эволюции различных групп микроорганизмов, а также новые методы исследований и биотехнологические разработки.

Материалы сборника могут представлять интерес для широкого круга специалистов в области микробиологии и смежных дисциплин, а также преподавателей, аспирантов, студентов.

*Сборник издан при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
в рамках проекта Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий
на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1051)*

ISBN 978-5-89118-859-4

© ФИЦ Пушкинский научный центр
биологических исследований РАН

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание.....	3
СЕКЦИЯ 1.	
МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	14
Два типа везикул, секретлируемых хищными грамположительной и грамотрицательной бактериями: особенности формирования и участие в процессах межмикробного антагонистического взаимодействия <i>Абашина Т.Н., Звонарев А.Н., Поливцева В.Н., Есикова Т.З., Шорохова А.П., Носков А.Е., Сузина Н.Е.</i>	14
Микробное разнообразие глинистых барьерных материалов и скальных пород участка будущего ПГЗРО «Енисейский» <i>Абрамова Е.С., Попова Н.М., Сафонов А.В.</i>	16
Таксономическая ревизия семейства <i>Hurhomicrombiaceae</i> <i>Агафонова Н.В., Груздев Д.С., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.</i>	16
Мониторинг карантинных вирусов в растениях и плодах томата в Ростовской и Волгоградской области <i>Антипова Ю.А.</i>	18
Илициколины сибирских грибов <i>Corinectria</i> spp. и их фитотоксичность <i>Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Литовка Ю.А., Павлов И.Н.</i>	19
Получение накопительных культур бактерий цикла азота из подземных вод с нитратным и радионуклидным загрязнением вблизи шламохранилища АО «ЧМЗ» <i>Бандурин А.Д., Попова Н.М., Сафонов А.В., Вишнякова А.С.</i>	21
Новые подходы в идентификации бактерий рода <i>Ancylobacter</i> и реклассификация родов <i>Starkeya</i> , <i>Angulomicrobium</i> и <i>Methylorhabdus</i> <i>Белова А.А., Капаруллина Е.Н., Агафонова Н.В., Груздев Д.С., Доронина Н.В.</i>	22
Популяционная структура и спектр аллельных мутаций <i>M. tuberculosis</i> определяющих лекарственную чувствительность к антибактериальным препаратам в Ростовской области <i>Бережной С.А.</i>	24
Оценка биоремедиационного потенциала прибрежной зоны бассейна реки Оки в отношении антропогенного загрязнения <i>Вершинина Д.Д., Ветрова А.А., Иванова А.А., Стрелецкий Р.А., Сазонова О.И.</i>	25
Разнообразие бактериальных сообществ районов г. Мурманска, отличающихся уровнем антропогенной нагрузки и степенью загрязнения ПАУ и металлами <i>Ветрова А.А., Сазонова О.И., Иванова А.А., Корнейкова М.В., Стрелецкий Р.А., Новиков А.И., Слуковская М.В., Гавричкова О.В.</i>	26

Определение численности стрептомицетов из разных почв и выделение их в чистую культуру <i>Гембицкая Е.А.</i>	28
Многослойные перцептронные и когнитронные модели морфогенеза цианобактериальных матов и биоминерализации строматолитов <i>Градов О.В.</i>	29
Исследование биологических свойств деградированных почвенных экосистем Астраханского региона <i>Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Аникина Е.А., Бударова В.Ю., Братилова Д.М.</i>	31
Разнообразие и представленность микробиоты цикла серы в условиях техногенной нагрузки на поздних стадиях почвообразовательного процесса <i>Дёмин К.А., Горовцов А.В., Сушкова С.Н.</i>	33
Таксономический состав культивируемых бактерий-антагонистов возбудителя жёлтой болезни гиацинта <i>Xanthomonas hyacinthi</i> в микробиоте растений подсемейства <i>Scilloideae</i> <i>Дренова Д.Д., Шабунина Д.В., Дренова Н.В., Кондратьев М.О.</i>	35
Влияние факторов культивирования на фосфат мобилизующую способность почвенных бактерий <i>Pantoea brenneri</i> <i>Егорова Е.А., Сулейманова А.Д.</i>	37
Новая анаэробная спорообразующая бактерия из арктической прибрежной почвы <i>Захарюк А.Г., Зиновьева О.В., Щербакова В.А.</i>	38
Скрининг микроводорослей <i>Chlorophyta</i> , способных к росту на жидких отходах производства <i>Зиганишина Э.Э., Булынина С.С., Юрьева К.А., Зиганишин А.М.</i>	39
Океанические планктонические гомологи декорирующего капсид белка Нос бактериофага RB30 <i>Зимин А.А., Никулина А.Н., Никулин Н.А., Коцаев А.Г., Xia H., Lu Y., Дроздов А.Л.</i>	41
Кандидат-основатель нового семейства <i>Bunquisepoviridae</i> и рода <i>Bunquisepovirus</i> умеренный бактериофаг <i>Enterococcus</i> B1578 <i>Казанцева О.А., Семкин Д.А., Шадрин А.М.</i>	43
Применение нового вычислительного метода TemPhD для обнаружения умеренных бактериофагов из необработанных данных NGS <i>Казанцева О.А., Шадрин А.М.</i>	44
Эндوفитные дрожжи в плодах сельскохозяйственных культур <i>Качалкин А.В., Глушакова А.М., Стрелецкий Р.А., Томашевская М.А., Савченко В.Е., Венжик А.С., Лепешко А.А.</i>	46
Обилие и разнообразие прокариотных сообществ зональных ферраллитных почв и сопряженных субстратов (опад и «подвешенная почва») заповедников Вьетнама <i>Князева А.В., Лысак Л.В.</i>	47
Влияние бензина на ростовые свойства микромицетов <i>Ковалёва И.А., Малахова У.А.</i>	49
Динамика устойчивости к антибиотикам сапрофитных стафилококков – симбионтов кожи здоровых людей <i>Кожина Э.В., Полюдова Т.В.</i>	51
Автохтонные микроорганизмы засоленных почв Республики Казахстан <i>Кондрашова М.М., Ванькова А.А., Дренова Н.В., Ибраева М.А.</i>	53
Антагонистическая активность клинических изолятов коагулазонегативных стафилококков <i>Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В.</i>	54

Видовой состав микромицетов, ассоциированных с растениями рапса озимого некоторых регионов России <i>Костин Н.К., Кузнецова А.А., Дудченко И.П., Шухин Д.И., Сердюк О.А.</i>	56
Изучение микробиома шлам-лигнина и субстратов на их основе после твердофазной ферментации для создания почвогрунтов <i>Кочаровская Ю.Н., Севостьянов С.М., Демин Д.В., Делеган Я.А.</i>	59
Разнообразие зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы» <i>Кривина Е.С., Темралеева А.Д.</i>	61
Устойчивость микобиоты пустынных почв к воздействию высоких доз ионизирующего излучения (γ -лучи и ускоренные электроны) <i>Крючкова М.О.</i>	63
Таксономическая идентификация прокариот хемоклина меромиктического озера Светлое и оценка влияния пробоподготовки на состав микробных сообществ <i>Ловдина Т.И., Червопкина А.С., Аксенов А.С., Воробьева Т.Я., Забелина С.А.</i>	64
Характеристика микробного сообщества с поверхности образцов органического остекления с многослойным покрытием <i>Миронская Е.А., Фуфыгина Е.С., Яковлева Г.Ю.</i>	66
Выделение фосфатмобилизующих бактерий из почвы <i>Мокрушина С.Э.</i>	68
Биотехнологический потенциал заквасочной микрофлоры национального лезгинского напитка тач <i>Никитина А.В., Харина Е.И.</i>	69
Бактериофаги и бактерии мраморного рака (<i>Procambarus</i> sp. Ortmann, 1905) <i>Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.Е., Сузина Н.Е., Зимин А.А.</i>	71
Устойчивость к ультрафиолету двух новых бактериофагов бактерий рода <i>Streptomyces</i> <i>Никулина А.Н., Рябова Н.А., Lu Y., Зимин А.А.</i>	73
Бактериофаг <i>KeBaboquartus</i> образует плазмидный профаг в штамме <i>Bacillus thuringiensis</i> КВАВ4 <i>Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.</i>	74
Метаболический потенциал бактерий рода <i>Pseudomonas</i> выделенных из подземных вод с нитратным и радионуклидным загрязнением <i>Попова Н.М., Барина А.В., Сафонов А.В., Бабич Т.Л.</i>	76
Нитрификация в техногенно-преобразованных почвах шламонакопителя озера Атаманского (Ростовская область) <i>Пуликова Е.П., Горовцов А.В., Литвинов Ю.А., Минкина Т.М.</i>	76
Проблемы классификации морфологически сходных осцилляториевых цианобактерий на примере родов <i>Leptolyngbya</i> , <i>Muxacoris</i> и <i>Pseudophormidium</i> <i>Рабочая Д.Е., Величко Н.В.</i>	78
Анализ последовательностей белка TolC из <i>Escherichia coli</i> , ключевого компонента TolC-содержащих помп грамотрицательных бактерий <i>Ралдугина В.Н., Назаров П.А.</i>	80
Новые находки <i>Desarmillaria ectypa</i> на севере Западной Сибири <i>Рудыкина Е.А., Филиппова Н.В.</i>	81
Новые психротолератные анаэробные бактерии из арктических криопэгов <i>Рыжманова Я.В., Трофимов А.С., Трубицын В.Э., Сузина Н.Е., Щербакова В.А.</i>	83
Особенности влияния тяжёлых металлов на микробный ценоз почвы на примере тест-культур <i>Rhizobium trifolii</i> и <i>Bacillus subtilis</i> in vitro <i>Савченко А.А., Харина Е.И.</i>	85

Разнообразие бактериальных сообществ и химических компонентов в микрочастицах городов, расположенных в разных климатических поясах <i>Сазонова О.И., Ветрова А.А., Слуковская М.В., Корнейкова М.В., Васенев В.И., Иващенко К.В., Новиков А.И., Иванова А.А., Полледжони П., Маттиони К., Ристорини М., Оккиутто Д., Канепари С., Гавричкова О.В.</i>	87
Первичные данные о культивируемых микроскопических грибах в фито-очистных сооружениях <i>Сайнчук А.Д., Александрова А.В., Харитонов С.Л., Щеголькова Н.М.</i>	88
Динамическая микроэкология и эволюционная биология развития: объекты и методы <i>Скобников Н.Э., Зимин А.А.</i>	90
Микобиота новообразованных почв на отходах обогащения редкометалльных руд в Мурманской области <i>Сошина А.С., Корнейкова М.В., Слуковская М.В., Иванова Т.К., Красавцева Е.А., Максимова В.В., Мосендз И.А.</i>	91
Микробиота обследуемых в возрасте до 20 лет при дисбиозе толстого кишечника <i>Сулима М.О.</i>	92
Применение микробных биотестов для оценки изменений токсических эффектов металлов в условиях разных температур совместного действия <i>Сысолятина М.А., Царева М.С., Олькова А.С.</i>	94
Приготовление и исследование крема, обогащенного пробиотическими лактобактериями <i>Устюжанинова Л.В., Надолинская А.А.</i>	97
Микробное разнообразие родниковой воды Травертинового источника на территории памятника природы регионального значения в г. Ставрополе <i>Харина Е.И., Гасюкова М.В.</i>	99
Сообщества актинобактерий рода <i>Micromonospora</i> в городских почвах Ростова-на-Дону <i>Чайкина А.П., Горовцов А.В.</i>	100
СЕКЦИЯ 2.	
БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ	
МИКРООРГАНИЗМОВ; ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ	
Совместное применение бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков против штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> с множественной лекарственной устойчивостью <i>Абдраймова Н.К., Корниенко М.А., Беспятых Д.А., Городничев Р.Б., Шитиков Е.А.</i>	102
Характеристика F ₁ -зависимых некодирующих РНК у <i>Pseudomonas putida</i> BS3701 <i>Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.</i>	104
Calcium Regulating hormones <i>Ali Adeeb Hussein Ali</i>	105
Морфологическая пластичность и состав мембранных липидов штамма <i>Phaeotremella foliacea</i> LE-BIN 4616 <i>Амигуд Е.Я., Кияшко А.А., Серебряков Е.Б., Сенник С.В.</i>	106
Механизм антимикробного действия L-лизин α -оксидазы из гриба <i>Trichoderma</i> cf. <i>aureoviride</i> Rifai ВКМ F-4268D <i>Аринбасарова А.Ю., Лукашева Е.В., Бабаева Г., Меденцев А.Г.</i>	107
Обследование посадок картофеля на наличие X вируса картофеля (Potato virus X) в некоторых регионах Российской Федерации <i>Башкирова И.Г., Пручкина М.А., Шнейдер Ю.А.</i>	109

Роль ароматических аминокислот в механизме действия новых фунгицидных нуклеозидов с липофильной группой <i>Бидюк В.А., Макаров Д.А., Александрова Л.А., Жгун А.А., Александров А.И.</i>	111
Оценка генотоксического потенциала роданида калия в тест-системе Эймса <i>Бударова В.Ю., Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Ломтева Н.А., Кондратенко Е.И., Братилова Д.М.</i>	112
Биоконверсия холестерина рекомбинантными штаммами <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> с мутациями в генах окисления боковой цепи <i>Бяков А.А., Карпов М.В., Стрижов Н.И., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	114
Целевая инактивация генов пептидов с антимикробной активностью в геноме штамма <i>Vacillus pumilus</i> 3-19 <i>Васильева Ю.А.</i>	115
Белковая система антигенов <i>Vacillus anthracis</i> <i>Воронов А.В.</i>	116
Функционально-метаболическая активность микроорганизмов рода <i>Lactobacillus</i> , изолированных из вагинального биотопа <i>Годовалов А.П., Карпунина Т.И.</i>	117
Влияние нарингенина на рост и сигналинг <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viceae</i> <i>Гончарова А.М., Ломоватская Л.А.</i>	119
Поиск новых биотехнологически ценных целлобиозодегидрогеназ <i>Горина С.Ю., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i>	120
Исследование компонентного состава метаболитов бактерий <i>Nocardioopsis umidischolae</i> методом качественных реакций <i>Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Братилова Д.М.</i>	122
Молекулярно-генетическая характеристика штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории ЮФО и СКФО <i>Деняк А.К., Хачатурова А.А.</i>	124
Стерин-деградирующая активность и геномная последовательность <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> ВКМ Ас-1171 <i>Довбня Д.В., Брагин Е.Ю., Ивашина Т.В., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	126
Разработка новых материалов на основе хитозана для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галерее от микробиологического поражения <i>Ермолюк А.А., Авданина Д.А., Хайрова А.Ш., Шумихин К.В., Лопатин С.А., Жгун А.А.</i>	128
Бактериальный белок MF3: возможные механизмы его защитного действия против вируса табачной мозаики и рост-стимулирующих эффектов <i>Ерохин Д.Е., Щербакова Л.А., Эммер Д.Я., Чудакова К.А., Джавахия В.Г.</i>	130
Ключевая роль активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны грибов в продукции вторичных метаболитов <i>Жгун А.А., Думина М.В., Валиахметов А.Я., Эльдаров М.А.</i>	133
Характеристика некоторых коммерческих пробиотических штаммов дрожжей <i>Saccharomyces</i> и выделенных в Болгарии новых штаммов молочнокислых бактерий <i>Жучкина Н.И., Кокорева А.Н., Колтовая Н.А.</i>	135
Связано ли голодание дрожжей <i>Candida maltosa</i> с апаптозом? <i>Звоначев А.Н., Русакова Т.Г., Валиахметов А.Я., Дмитриев В.В.</i>	137
Азотный статус <i>Pseudomonas putida</i> BS3701 и дифференциальная экспрессия некоторых консервативных межгенных участков <i>Иванова Е.В., Позднякова-Филатова И.Ю.</i>	139

Применение методов диагностики растительных экстрактов зернобобовых культур на наличие возбудителя бактериального ожога гороха <i>Игнатьева И.М., Кононова Е.П., Доморацкая Д.А.</i>	140
Молекулярно-генетическая организация IncP-7 плазмиды pD4A-46, контролирующей устойчивость к тетрациклину <i>Измалкова Т. Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.</i>	141
Разработка молекулярно-биологического подхода к восстановлению зубной эмали <i>Калинина А.Е., Савельева П.Д., Кошель Е.И., Нургалиев И.М.</i>	142
Клеточные модели <i>N. gonorrhoeae</i> с β -лактамазой расширенного спектра действия <i>Кандинов И.Д., Винокурова А.С., Антонова О.В., Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А.</i>	145
Модификация питательных сред для культивирования пропионовокислых бактерий экстрактом <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. <i>Карапетян М.Г.</i>	147
Индукция структурных мутаций под действием γ -квантов и тяжелых ионов в гаплоидных эукариотических клетках <i>Кокорева А.Н., Жучкина Н.И., Колтовая Н.А.</i>	148
Применение метода MAHDS для построения множественных выравниваний аминокислотных последовательностей <i>Костенко Д.О., Коротков Е.В.</i>	151
Биосинтез фосфолипидов у базидиомицетов: вклад основного и альтернативного путей, включая реакции ремоделирования жирных кислот, в определение молекулярного разнообразия <i>Котлова Е.Р., Сеник С.В., Серебряков Е.Б., Мишарев А.Д., Манжиева Б.С., Пожванов Г.А., Пузанский Р.К., Псурцева Н.В.</i>	153
Оценка сезонной динамики генетического и таксономического состава бактериальных сообществ в пелагиали и литорали озера Байкал <i>Краснопеев А.Ю., Букин Ю.С., Галачьянц А.Д., Потапов С.А., Тихонова И.В., Белых О.И.</i>	155
Изменение вирулентных свойств микросимбионтов <i>Lactobacillus spp</i> в ассоциации с простейшими <i>Blastocystis hominis in vivo</i> <i>Красноперова Ю.А., Мехманова С.Ш., Хуснатднова Е.А.</i>	157
Сравнительный геномный анализ вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Ставропольского края <i>Красовская Т.Л.</i>	159
Транскриптомный подход для поиска новых перспективных антимикробных ферментов <i>Lysobacter capsici</i> VKM В-2533 ^T <i>Кудрякова И.В., Афошин А.С., Тарлачков С.В., Леонтьевская Е.А., Сахарова С.А., Галемина И.Е., Зеленев Д.В., Леонтьевская Н.В.</i>	161
N-концевые ацетилтрансферазы бактерии <i>Thermus thermophilus</i> : идентификация и изучение физико-химических свойств <i>Кудряшов Т.А., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Соколов А.С., Локтюшов Е.В., Вологжанникова А.А., Шевелева М.П., Лаптева Ю.С.</i>	162
Анализ экспрессии одиннадцати генов SWEET в растительно-микробной системе <i>Medicago lupulina</i> и <i>Rhizophagus irregularis</i> в условиях внесения дозы фосфора в субстрат <i>Кудряшова Т.Р., Крюков А.А., Горбунова А.О., Иванченко О.Б., Юрков А.П.</i>	163
Геномный анализ ризосферного штамма <i>Pseudomonas protegens</i> P4-2, способного стимулировать рост растений и деградировать <i>n</i> -алканы <i>Кузнецов А.В., Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Михайлов П.А., Пунтус И.Ф.</i>	165

Роль PAS-домена сенсорной гистидинкиназы Hik33 в регуляции стрессовых ответов у <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 GT-L Леусенко А.В., Миронов К.С., Лось Д.А.	167
Синтетические опероны для исследования регуляции стрессовых ответов у цианобактерий Леусенко П.А., Миронов К.С., Лось Д.А.	169
Влияние температуры на экспрессию генов термофильного штамма <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> ВКМ Ас-666 ^Т при биоконверсии холестерина Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Тарлачков С.В., Брагин Е.Ю., Донова М.В.	170
Применение метода SWATN в липидомике на примере исследования гетерогенного распределения фосфолипидов в культуре базидиального гриба <i>Flammulina velutipes</i> Манжиева Б.С., Сеник С.В., Серебряков Е.Б., Котлова Е.Р.	172
Разработка водорастворимых форм антиоксиданта астаксантина и его эфиров, выделенных из микроводоросли <i>Haematococcus pluvialis</i> Марченкова Н.С., Дудник А.Г., Куликов Е.А., Куликова И.С., Лукашевич С.В., Селищева А.А.	174
Изучение молекулярных особенностей бактериальных алкангидроксилаз Медведева А.Д., Богатыренко Е.А., Ким А.В.	175
Метаболические особенности использования маннита и метанола факультативным метилотрофом <i>Methylobrevis ramukkalensis</i> РК2 Мельников О.И., Розова О.Н.	177
Влияние кинетики микросостояний биохимической системы на её энтропию Минкевич И.Г.	178
Физиологические аспекты деградации углеводов штаммом <i>Pseudomonas veronii</i> 7p-81 Муллаева С.А., Стрелецкий Р.А., Делеган Я.А., Сазонова О.И., Иванова А.А., Ветрова А.А.	179
Эндолизин бактериофага 3 <i>Aeromonas</i> – кальцийзависимая пептидогликангидролаза Мусаева А.А., Чернышов С.В., Молочков Н.В., Прохоров Д.А., Микулинская Г.В.	181
Исследование состава и амилолитической активности внеклеточных белков <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Bacillus thuringiensis</i> Мустафина А.Д., Анканиева А.В., Цветков В.О., Яруллина Л.Г.	183
Развитие моделей трансдукции плазмид псевдо-Т-четными бактериофагами Никулина А.Н., Никулин Н.А., Зимин А.А.	185
Клонирование генов эндоглюканаз из актинобактерии <i>Streptomyces spiralis</i> ВКМ Ас-1311 Петракова М.П., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.	187
Мутации в С-концевом домене Н ⁺ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : влияние на ее функционирование Петров В.В.	188
Внутренняя асимметрия сайта связывания транскрипционных факторов LysR-семейства Позднякова-Филатова И.Ю., Захарова М.В.	190
Создание и функциональный анализ рекомбинантных штаммов <i>Escherichia coli</i> , несущих ген мутантного цитохрома P450 BM3 Пошехонцева В.Ю., Стрижов Н.И., Сазонова О.И., Николаева В.М., Шутов А.А., Донова М.В.	191
Гены, вовлеченные в синтез трегалолипидов в штамме <i>Rhodococcus qinqshengii</i> F2-2 Пунтус И.Ф., Позднякова-Филатова И.Ю., Делеган Я.А., Ахметов Л.И., Абрамова Т.Н., Захарова М.В., Филонов А.Е.	193

Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> для конъюгативного переноса плазмидной ДНК в <i>Rhodococcus qingshengii</i> X5 <i>Режепова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю., Петриков К.В.</i>	195
Новые структурные особенности алкалофильных грибных лакказ <i>Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i>	196
Характеристика взаимодействия белков нуклеоида микроорганизма <i>Pseudomonas putida</i> BS3701 с регуляторной областью генов катаболизма нафталина <i>Рыжих Ю.С., Иванова Е.В., Фролова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю.</i>	197
Специфичность CYSYM-белков <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Звонарев А.Н., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В.</i>	199
Последние достижения биоинформатики для количественного и функционального анализа данных метагенома и метатранскриптома в микробиальных сообществах <i>Соломенникова Ю.Н.</i>	200
Физиологические особенности штамма <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppx1 <i>Трилисенко Л.В., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В.</i>	201
Эволюционное происхождение генов ненасыщенной хондроитин дисахарид-гидролазы семейства GH88 у бактерий <i>Sphaerochaetaceae</i> <i>Трошина О.Ю., Наумов Д.Г., Щербакова В.А.</i>	203
Поиск аминокислотных детерминант высокой окислительной активности двухдоменных лакказ методом сайт-направленного мутагенеза <i>Трубицина Л.И., Абдуллатыпов А.В., Трубицин И.В., Лисов А.В., Понаморёва О.Н., Леонтьевский А.А.</i>	205
Изучение свойств новой N-ацетилтрансферазы RimL бактерии <i>Thermus thermophilus</i> <i>Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Болдаевский И.С., Соколов А.С., Локтюшов Е.В., Вологжанникова А.А., Шевелева М.П., Лантева Ю.С.</i>	206
Активность промоторов оперонов <i>groESL</i> метилотрофных бактерий <i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20T и <i>Methylobacterium brachiatum</i> B0021T <i>Фирсова Ю.Е.</i>	207
Рекомбинантная холестериноксидаза из <i>Nocardioides simplex</i> <i>Фокина В.В., Карпов М.В., Коллеров В.В., Брагин Е.Ю., Эпиктетов Д.О., Шутов А.А., Свиридов А.В., Донова М.В.</i>	209
Скрининг представителей рода <i>Gordonia</i> по способности к деструкции углеводов <i>Французова Е.Э., Делеган Я.А.</i>	211
Новые аммиак-лиазы ароматических аминокислот из <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP: филогенетический анализ и молекулярное моделирование <i>Фролов Д.С., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i>	213
Фотобиомодуляция микробиоты кишечника человека <i>in vitro</i> с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения <i>Храмов Р.Н., Заломова Л.В., Фесенко Е.Е. (мл.)</i>	215
Универсальный алгоритм молекулярно-генетического анализа для оценки токсичности веществ и природных сред <i>Царева М.С., Олькова А.С., Козвонин В.А.</i>	217
Штамм-нефтедеструктор <i>Rhodococcus qingshengii</i> F2-2, обладающий фитостимулирующими свойствами <i>Чайка Н.Я., Захарченко Н.С., Анохина Т.О., Позднякова-Филатова Т.Ю., Шутов А.А., Делеган Я.А., Звонарев А.Н., Филонов А.Е.</i>	218

Измерение эффективности терминаторов транскрипции в <i>Rhodococcus</i> с помощью флуоресцентных репортёров Чуйко М.С., Шемякина А.О., Гречишников Е.Г., Лавров К.В., Яненко А.С.	220
Светоиндуцируемые стрессовые белки HliA и HliB цианобактерии <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Шарапова Л.С., Юрина Н.П., Постникова Э.П.	222
Ферментный препарат на основе клеток <i>Nocardioides simplex</i> для получения ценных 1(2)-дегидрированных 3-кетостероидов Яппаров Р.Р., Фокина В.В., Донова М.В.	223
СЕКЦИЯ 3.	
РЕСУРСНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ	
МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ	
Интегральная схема скрининга природных штаммов дрожжей <i>S. cerevisiae</i> , перспективных для хересования виноматериалов Авданина Д.А., Жгун А.А.	226
Цитотоксический эффект низкомолекулярного пептида из <i>Trichoderma</i> cf. <i>aureoviride</i> Rifai ВКМФ-4268D на бактерии рода <i>Listeria</i> Аринбасарова А.Ю., Борзенков В.Н., Меденцев А.Г.	228
Получение пигмента из биомассы микроводорослей Баранова С.В.	230
Физиологические особенности и метаболический потенциал галотолерантной бактерии <i>Pseudomonas xanthomarina</i> штамм NP2(1570), выделенной из сверхглубоких высокоминерализованных подземных вод Баранова А.В., Попова Н.М., Бабич Т.Л., Сафонов А.В.	231
Физиолого-биохимические и генетические особенности полиэкстремофилии уникальных багрянковых микроводорослей <i>Galdieria</i> и их биотехнологический потенциал Болычевцева Ю.В., Стадничук И.Н.	232
Влияние перфорирования клеточных мембран на дыхательную активность бактерий Быков А.Г., Барсук Д.А., Решетилов А.Н.	234
Разработка технологии получения протеолитических ферментных препаратов на основе микромицетов Голомидова В.И., Устюжанинова Л.В.	235
Актинобактерии рода <i>Nocardioopsis</i> – перспективные агенты биологического контроля фитопатогенов Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Братилова Д.М.	237
Разработка инновационных биологических препаратов на основе природных штаммов рода <i>Bacillus</i> Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н.	238
Модели микробных сенсоров для исследования биохимических особенностей микроорганизмов Емельянова Е.В.	240
Синтез гуминовых веществ лакказой, иммобилизованной на почвенных минералах Заварзина А.Г., Демин В.В., Белова О.В., Леонтьевский А.А., Лисов А.В.	242
Микробное сообщество донных отложений р. Упа, находящейся в зоне поражения ЧАЭС, и его роль в образовании биогеохимического барьера Зеленина Д.А., Артемьев Г.Д., Соболев Д.А., Кузьменкова Н.В., Сафонов А.В.	243

Пределы выносливости растений-мелиорантов, инокулированных эндотрофными микромицетами <i>Neonectria macrodidyma</i> и <i>Fusarium tricinctum</i> , к различным концентрациям нефти в субстрате <i>Исупова А.А., Бухарина И.Л.</i>	244
Протопластирование и мутагенез грибной культуры <i>Gibberella zeae</i> ВКМ F-2600: получение активных продуцентов урсодезоксихолево́й кислоты <i>Коллеров В.В., Донова М.В.</i>	246
Деструкция фунгицида карбендазима иммобилизованными актинобактериями <i>Rhodococcus</i> <i>Кувичкина Т.Н., Капарулина Е.Н., Доронина Н.В., Решетилов А.Н.</i>	248
Использование эндофитных штаммов бактерии <i>Bacillus subtilis</i> для повышения эффективности фиторемедиации <i>Курамшина З.М., Саттарова Л.Р. Максимов И.В.</i>	249
Исследование возможности получения этилового спирта из молочной сыворотки <i>Леушина А.Д., Устюжанинова Л.В.</i>	251
Приживаемость бактерий поликомпонентного бациллярного препарата на семенах различных сельскохозяйственных культур <i>Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.</i>	253
Антибактериальные свойства <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 3872 против антибиотикорезистентных бактериальных инфекций <i>Мачулин А.В., Абрамов В.М., Косарев И.В., Карлышев А.В.</i>	255
Экстремотолерантный организм <i>Aspergillus niger</i> AM1 <i>Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т.</i>	256
Влияние концентрации азота на биосинтез лимонной кислоты у дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А.</i>	257
Солюбилизация <i>n</i> -гексадекана в воде в присутствии бактериальных поверхностно-активных веществ <i>Парфенова А.С.</i>	259
Способы детекции антагонистической активности микроорганизмов <i>Полудова Т.В., Коробов В.П., Лемкина Л.М., Есаев А.Л.</i>	261
КПД ферментного/микробного топливного элемента; влияние наноматериалов <i>Решетилов А.Н., Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Аряпов В.А.</i>	263
Механизмы положительного влияния ризобактерий на рост сельскохозяйственных культур <i>Светлакова Н.А., Серазетдинова Ю.Р., Асякина Л.К.</i>	265
Бактерии рода <i>Streptomyces</i> как наиболее важные актиномицеты и их влияние на развитие растений <i>Светлакова Н.А., Серазетдинова Ю.Р.</i>	266
Использование бактериофага Kigov в качестве агента биоконтроля <i>B. cereus</i> в пищевых продуктах <i>Скорынина А.В., Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.</i>	268
Интенсификация культивирования и подбор условий хранения биомассы <i>Rhodospseudomonas palustris</i> <i>Старыгина П.А., Чудакова О.О., Кондратьева Т.Д., Черкасов Р.О.</i>	270
Влияние содержания углеродсодержащего субстрата в среде на накопление грибом <i>Trametes polyzona</i> SUB8447059 биомассы <i>Сысоева М.А., Сысоева Е.В., Прозорова И.Ш., Бычкова Е.А., Зыкова В.В.</i>	271
<i>Pseudomonas fluorescens</i> как продуценты целлюлолитических ферментов <i>Третьякова О.М., Третьякова Е.М.</i>	273

Биолюминесцентный сенсор на основе G-квадруплекса для обнаружения специфических последовательностей нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов Филатов П.В., Горбенко Д.А.	275
Циклодекстрины в лакказном окислении стероидных спиртов: от ингибирования к синтезу Хомутов С.М., Шутов А.А., Довбня Д.В., Донова М.В.	276
Присутствие почвенных термофильных бактерий-нефтедеструкторов в нефтяных загрязнениях вблизи ж/д станции Кушелевка Хорунжая А.В., Журавлева А.С., Баженова И.А.	278
Совместное выделение биологически ценных продуктов из пурпурных несерных бактерий Чудакова О.О., Ашихмин А.А., Старыгина П.А.	279
Биоразнообразие эндофитных микроорганизмов плодов яблони (<i>Malus domestica</i>) Шабля А.С., Ванькова А.А., Дренова Н.В.	281
Определение фитопатогенности культивируемых бактерий-антагонистов <i>Erwinia amylovora</i> Шабунина Д.В., Дренова Н.В., Кондратьев М.О., Джалилов Ф.С.	283
Морфолого-культуральная и физиолого-биохимическая характеристика молочнокислых бактерий виноделия Республики Крым Шаламитский М.Ю., Танащук Т.Н.	285
Комплексное биотехнологическое использование лиственной целлюлозы с применением препаратов карбогидраз и <i>Bacillus coagulans</i> Шевченко А.Р., Пучнина А.А., Аксенов А.С., Майорова К.А., Родичева М.А.	286
Перспективы использования биопрепаратов на основе цианобактериальных культур в сельском хозяйстве Шишкина Е.В., Устюжанинова Л.В.	288
Скрининг коллекционных штаммов и природных изолятов <i>Fusarium</i> spp. и <i>Aspergillus flavus</i> с целью выявления наиболее активных продуцентов двух фузариотоксинов и афлатоксина В1 Щербакова Л.А., Микиютк О.Д., Назарова Т.А., Зоров И.Н.	290
Биовыщелачивание арсенопиритного флотоконцентрата штаммом <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> TFBk Ячкула А.А., Носков А.Е., Абашина Т.Н.	292

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Два типа везикул, секретируемых хищными грамположительной и грамотрицательной бактериями: особенности формирования и участие в процессах межмикробного антагонистического взаимодействия

Абашина Т.Н.¹, Звонарев А.Н.¹, Поливцева В.Н.¹, Есикова Т.З.¹,
Шорохова А.П.¹, Носков А.Е.², Сузина Н.Е.¹

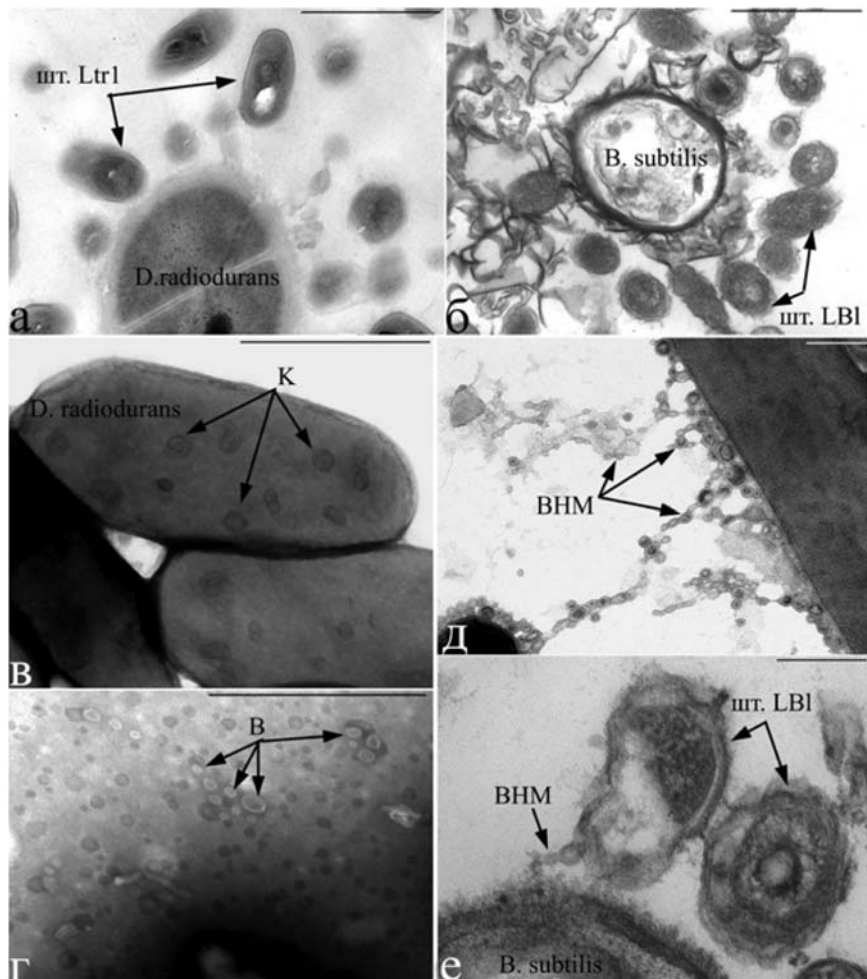
¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), suzina_nataliya@rambler.ru

² Пушинский государственный естественнонаучный институт

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251

Из двух различных природных биотопов выделены два штамма бактерий с высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра бактерий, обладающие способностью секретировать во внеклеточное пространство мембранные везикулы разного генеза: грамположительная бактерия (шт. Ltr1) наиболее близкая по своему филогенетическому положению к типовому штамму *Microbacterium paraoxydans*^T CF36 (AJ491806) и грамотрицательная бактерия (шт. Lb1), представитель рода *Lysobacter*, ближайшими филогенетически родственными видами которого являются бактерии *L. solanacearum*. Оба штамма выделены с поверхности кожных покровов различных видов животных, образ жизни которых, так или иначе связан с водной средой. Грамположительная бактерия шт. Ltr1, выделена с поверхностных покровов личинки тритона и по своим морфологическим характеристикам и ультраструктурным признакам может быть отнесена к ультрамикробактериям (УМБ) (1). Новый изолят шт. Ltr1, проявляет высокую антимикробную активность в отношении целого ряда грамположительных (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Deinococcus* и др.) и грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas putida*, фитопатогенной бактерии *Erwinia herbicola* и др.). Грамотрицательная бактерия *L. solanacearum* выделена с поверхности кожного покрова шпорцевой водной лягушки *Xenopus laevis*. Показано, что штамм Lb1 способен подавлять рост ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. Проведено комплексное электронно-микроскопическое исследование природы, механизмов и особенностей образования двух типов везикул, моделирование участия везикул в процессах межмикробного антагонистического взаимодействия. Клетки штамма Ltr1 формируют везикулы при участии цитоплазматической мембраны, которые предположительно путем пассивной диффузии проходят через слой пептидогликана клеточной стенки и высвобождаются в межклеточное пространство. Электронно-микроскопический анализ тотальных негативно окрашенных препаратов и ультратонких срезов целых клеток шт. Ltr1 показал наличие характерных кратероподобных структур (К) и локальных специфических инва-

Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия. а, б – взаимодействие шт. Ltr1 с бактерией-жертвой *Deinococcus radiodurans* (а) и шт. Lb1 с бактерией-жертвой *Bacillus subtilis* (б) по типу “Wolf Pack” (ультратонкие срезы); в – характерные кратерообразные структуры в цитоплазматической мембране клеток штамма Ltr1 (негативное контрастирование); г – везикулы цитоплазматической мембраны, секретируемые клетками шт. Ltr1 в присутствии бактерии-жертвы (негативное контрастирование); д, е – везикулы наружной мембраны, секретируемые клетками шт. Lb1 в присутствии бактерии-жертвы (д – негативное контрастирование; е – фрагмент ультратонкого среза).
 Длина масштабной метки: а, б, г – 1 мкм; г – 0,5 мкм; д, е – 0,2 мкм



гинаций цитоплазматической мембраны (ЦМ) в зоне формирования везикул (рис. 1в). Зоны формирования и высвобождения везикул дискретно распределены по всей поверхности ЦМ. Клетки штамма Lb1 формируют везикулы при участии наружной мембраны и часто ассоциированы с пиллями, характерными для этого вида бактерий (рис. 1д, е) (2). Клетки обоих штаммов секретируют везикулы, синтез и секреция которых носит индуцибельный характер, их секреция наблюдалась только в присутствии бактерии-жертвы. Оба штамма реализуют хищную стратегию антагонистического межмикробного воздействия по типу «волчья стая» или “Wolf Pack” (рис. 1а, б), который известен для представителей бактерий рода *Lysobacter*.

Оба типа внеклеточных везикул, секретируемых модельными штаммами грамотрицательных и грамположительных бактерий, обладают выраженным антимикробным действием. Вероятно, оба новых изолята, грамположительная ультрамикробактерия *Microbacterium paraoxydans* (шт. Ltr1) и грамотрицательная бактерия *Lysobacter solanacearum* (шт. Lb1), являющиеся эбионтами кожных покровов макроорганизмов, могут нести жизненно важную защитную функцию.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00132 А.

Литература

1. Vitaly I. Duda, Natalia E. Suzina, Alexander M. Boronin. Ultramicrobacteria. eLS. 2020.
2. Jiaojiao Chen et al. Applied Microbiology and Biotechnology (2018) 102:7509–7519.

Микробное разнообразие глинистых барьерных материалов и скальных пород участка будущего ПГЗРО «Енисейский»

Абрамова Е.С., Попова Н.М., Сафонов А.В.

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
abramova-es98@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38252

Долговременная изоляция радиоактивных отходов (РАО) в соответствии с требованиями Международного агентства по атомной энергетике должна производиться с использованием системы инженерных барьеров, обеспечивающих их безопасность для окружающей среды. При моделировании долговременной безопасности хранилища все больше внимания уделяется комплексным биогеохимическим процессам преобразования инженерных барьеров: стали, бетона, глин. Целью данной работы является оценка микробного разнообразия глинистых материалов и проб воды и осадков, отобранных с участка «Енисейский» (г. Железногорск Красноярского края), а также анализ влияния микробной жизнедеятельности на устойчивость барьерных систем.

В работе исследовали микробное разнообразие сообществ вод и осадков, полученных из зоны расположения будущего хранилища «Енисейский» (объектовая глубина 450 м) в Красноярском крае и глинистых материалов бентонитового и каолинового типов, которые предполагаются использовать в хранилище.

На основании анализа последовательности генов 16S рПНК в пробах глин бентонитового и каолинового типов обнаружены микроорганизмы бродильного типа метаболизма, а также биогеохимических циклов серы и железа. Их жизнедеятельность может способствовать процессам коррозии стальных контейнеров и цементных материалов, а также деструкции и преобразованию глин. Важно отметить, что в глинистых материалах доминировала органотрофная аэробная микрофлора, принесенная в ходе подготовки и транспортировки материала (представители семейства *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*). В пробах воды и осадков с объектовой обнаружены представители родов *Hydrogenophaga* и *Methanobacterium*, способные к метанообразованию, а также филума *Desulfobacterota*, многие представители которого способны к сульфатредукции и метаногенерации, могут использовать водород и Fe(II) в качестве донора электронов, что может приводить к коррозии стали и цемента.

В лабораторных экспериментах установлено, что интенсификация развития микрофлоры глинистых материалов и пород может происходить при доступе водорода (основного продукта радиолиза воды), железа, как продукта коррозии стали и растворения вмещающих пород, а также продуктов выщелачивания алюмофосфатных стеклянных матриц с радиоактивными отходами.

Таксономическая ревизия семейства *Hyphomicrobiaceae*

Агафонова Н.В.¹, Груздев Д.С.², Капарулина Е.Н.¹, Доронина Н.В.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
nadyagafonova@gmail.com

² SciBear OU

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38253

Семейство *Hyphomicrobiaceae* относится к порядку *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria* и включает 11 родов (<https://lpsn.dsmz.de/family/hyphomicrobiaceae>): *Hyphomicrobium* (типовой род),

Rhodomicrobium, *Pedomicrobium*, *Seliberia*, *Prosthecomicrobium*, *Filomicrobium*, *Dichotomicrobium*, *Methyloligella*, *Methyloceanibacter*, *Limoniibacter* и *Caenibius*. В нашей работе по описанию нового вида *Methyloligella maris* sp. nov. выявлено, что, согласно анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, представители рода *Methyloligella* имели 95.2–96.2% сходства с представителями рода *Methyloceanibacter* (сем-во *Hyphomicrobiaceae*), 94.3–94.6% с '*Methylothermalis aethiopiae*' (порядок *Hyphomicrobiales*), 93.2–93.4% с *Rhodoligotrophos defluvii* (сем-во *Parvibaculaceae*) и 92.4–92.9% с представителями семейств *Hyphomicrobiaceae*, *Tepidamorphaceae*, *Afifellaceae* и *Rhodobiaceae*. Полученный разброс указывал на немонофилетичность семейства *Hyphomicrobiaceae*, которую отмечали ранее Oren и Xu (Oren, Xu, 2014). Поэтому в данной работе мы провели таксономическую ревизию семейства *Hyphomicrobiaceae* на основании филогенетического и филогеномного анализа, а также совокупности морфологических и физиологических отличий.

Филогеномное дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей 120 консервативных маркерных генов из доступных геномов представителей порядка *Hyphomicrobiales*, выявило три независимые клады: (1) клада *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и *Methylothermalis*, (2) клада *Dichotomicrobium* и *Rhodomicrobium* и (3) клада *Hyphomicrobium*, *Filomicrobium*, а также *Pedomicrobium*, который сгруппирован с этими родами на филогенетическом дереве, построенном на основе последовательностей гена 16S рРНК. Это деление поддерживалось пороговыми значениями ААИ, предложенными для разделения таксонов (45–65% для одного семейства, 65–95% для одного рода и 95–100% для одного вида) и значительными фенотипическими отличиями бактерий внутри каждой клады.

1) Высокие значения ААИ между представителями родов *Methyloligella*, *Methyloceanibacter*, *Methylothermalis* (66.2–74.8%) и сходная морфология клеток (непигментированные, неподвижные палочки, размножаются бинарным делением; отсутствуют жгутики, гифы, простеки, дихотомически ветвящиеся гифы) четко обособляют их от представителей родов *Hyphomicrobium*, *Filomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Dichotomicrobium* и *Rhodomicrobium*. Мы предлагаем отнести представителей родов *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и '*Methylothermalis*' к новому семейству *Methyloligellaceae* fam. nov.

2) Согласно филогеномному дереву, значениям ААИ, а также таксономии GTDB, представители родов *Dichotomicrobium* и *Rhodomicrobium* также обособляются в отдельное семейство, для которого предложено название *Rhodomicrobiaceae* fam. nov. Поскольку между этими родами все же имеются некоторые физиологические различия, вероятно, филогенетическое положение *Dichotomicrobium* будет уточняться при появлении новых представителей этого рода.

3) Третья клада объединила почкующих, нефототрофных, образующих простеки представителей родов *Hyphomicrobium*, *Filomicrobium* и *Pedomicrobium*. Положение на филогеномном дереве коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК и фенотипическими свойствами, что подтверждает исходную принадлежность этих родов к семейству *Hyphomicrobiaceae*.

Согласно анализу геномов показано, что представители родов *Limoniibacter* и *Caenibius* не относятся к семейству *Hyphomicrobiaceae*. Филогенетическое дерево, построенное на основе 120 консервативных маркерных генов, показало, что единственный представитель *Limoniibacter endophyticus* КСТС 42097^T принадлежит семейству *Phyllobacteriaceae*.

Caenibius tardaugens NBRC 16725^T (базоним *Novosphingobium tardaugens* NBRC 16725^T) недавно был отделен от рода *Novosphingobium* и отнесен к семейству *Hyphomicrobiaceae* (Hördt et al., 2020). Однако филогенетический анализ на основе последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм NBRC 16725^T имеет 95–97% сходства с представителями семейства *Erythrobacteraceae* (*Novosphingobium*, *Tsuneonella*, *Altererythrobacter*, *Croceicoccus*, *Alterericroceibacterium*, *Qipengyuania*, *Pseudopontixanthobacter* и др.) и менее 89% – с представителями семейства *Hyphomicrobiaceae*. Кроме того, *C. tardaugens* NBRC 16725^T на филогеномном дереве четко группируется с *Croceicoccus estronivorus* МН-В5^T – представителем семейства *Erythrobacteraceae*. Это дает основание для предложения перенести род *Caenibius* из семейства *Hyphomicrobiaceae* в семейство *Erythrobacteraceae*. В подтверждение этому, рассчитанное нами значение ААИ между штаммом NBRC 16725^T и его ближайшим родственником *Cr. estronivorus* МН-В5^T составило 76.9%, и менее 70% с другими представителями семейства *Erythrobacteraceae*. Кроме того, все представители рода *Croceicoccus* образуют желтопигментированные колонии, содержащие растворимый в метаноле пигмент, тогда как штамм МН-В5^T образует белые колонии. Таким образом, мы также предлагаем реклассифицировать *Croceicoccus estronivorus* как *Caenibius estronivorus* comb. nov.

Seliberia stellata отличается от других представителей *Hyphomicrobiaceae* специфической морфологией клеток (палочковидные с винтовым закручиванием поверхности, не почкующиеся, с асимметричным поперечным делением, роящиеся клетки). Согласно филогении по гену 16S рРНК, штамм *S. stellata* СЕСТ 7960 (HE795128, единственная доступная последовательность гена 16S рРНК в GenBank) относится к роду *Bradyrhizobium*, имеет 100% идентичность с *B. betae* PL7HG1^T и менее 89% сходства с представителями семейства *Hyphomicrobiaceae*. Результаты филогенетического анализа по генам 5S и 16S рРНК, а также MALDI-TOF-MS показали, что доступные в международных коллекциях штаммы *S. stellata* СЕСТ 7960 и VKM В-1340 принадлежат к виду *B. betae*, и они не родственны оригинальному штамму *S. stellata* INMI N-9^T (Velazquez et al., 2015; Hördt et al., 2020). Поскольку в настоящее время типовой вид рода *Seliberia stellata* не представлен ни одним типовым штаммом, статус рода *Seliberia* Aristovskaya and Parinkina 1963 остается открытым.

Таким образом, на основании проведенного комплексного анализа мы предлагаем реклассифицировать семейство *Hyphomicrobiaceae*: отделить два новых семейства *Methyloligellaceae* fam. nov. и *Rhodomicrobiaceae* fam. nov., перенести роды *Limoniibacter* и *Caenibius* в семейства *Phyllobacteriaceae* и *Erythrobacteraceae*, соответственно, а также реклассифицировать *Croceicoccus estronivorus* как *Caenibius estronivorus* comb. nov.

Литература

1. Oren A., Xu X. The family *Hyphomicrobiaceae*. The prokaryotes, 2014;247:281.
2. Hördt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M. et al. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. Front Microbiol 2020;11:468.
3. Velazquez E., Flores-Felix J.D., Sanchez-Juanes F., Gonzalez-Buitrago J.M., Peix A. The status of the genus *Seliberia* Aristovskaya and Parinkina 1963 (Approved Lists 1980) and the species *Seliberia stellate* Aristovskaya and Parinkina 1963 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65:2337-2340.

Мониторинг карантинных вирусов в растениях и плодах томата в Ростовской и Волгоградской области

Антипова Ю.А.

Российский Государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
juli.antipova@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38254

Мониторинг на присутствие возбудителей вирусных болезней в урожае необходимо производить, поскольку они являются сильным ограничивающим фактором во многих отраслях овощеводства. Гибель урожая некоторыми фитопатогенными вирусами может достигать до 100%.

Томат – важнейшая овощная культура с ежегодным увеличением объемов его производства во всем мире. В Российской Федерации последние несколько лет активно развиваются предприятия защищенного грунта, специализирующиеся на производстве томатов. Вместе с тем растения томата поражают более 200 различных вредителей и болезней [1].

В качестве методов детекции фитопатогенных вирусов используются: иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и с детекцией в агарозном геле [2, 3].

ИФА проводился на выявление следующих вирусов: вирус слабой зеленой мозаики табака (TMGMV), вирус бронзовости томатов (TSWV), вирус мозаики томата (ToMV), вирус мозаики табака (TMV).

ПЦР-РВ проводился на выявление следующих вирусов: вирус слабой зеленой мозаики табака (TMGMV), вирус бронзовости томатов (TSWV), вирус коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV), вирус кольцевой пятнистости томата (ToRSV), вирус кольцевой пятнистости табака (TRSV).

ПЦР с детекцией в агарозном геле проводилась с целью выявления следующих вирусов: вирус слабой зеленой мозаики табака (TMGMV), вирус мозаики томата (ToMV), вирус мозаики табака (TMV),

вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), на вирусы группы тобамовирусы с универсальными праймерами.

Полученные в данный момент результаты по областям

По результатам ИФА томатов Ростовской области выявилось присутствие вируса мозаики томата (ToMV) и мозаики табака (TMV). Встречается присутствие разных вирусов в одном образце, рекомендуется провести дополнительные исследования методом ПЦР.

По результатам ПЦР-РВ томатов Ростовской области не выявилось присутствие вируса слабой зеленой мозаики табака (TMGMV) и вируса коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV). Встречается присутствие вирусов мозаики томата и мозаики табака в одном образце, рекомендуется провести дополнительные исследования классическим методом ПЦР (электрофорез в агарозном геле).

По результатам классического ПЦР томатов Ростовской области на вирус мозаики томата (ToMV) результат отрицательный; на наличие комплекса тобамовирусов TMV, ToMV, ToBRFV результат отрицательный.

По результатам ИФА томатов Волгоградской области не выявилось присутствие всех исследуемых вирусов, кроме вирусов мозаики томата (ToMV) и мозаики табака (TMV). Встречается присутствие разных вирусов в одном образце, рекомендуется провести дополнительные исследования методом ПЦР.

По результатам ПЦР-РВ томатов Волгоградской области не установлено присутствие вируса бронзовости томатов (TSWV) и вируса коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV). Встречается присутствие вирусов мозаики томата и мозаики табака в одном образце, рекомендуется провести дополнительные исследования классическим методом ПЦР (электрофорез в агарозном геле).

По результатам классического ПЦР томатов Волгоградской области на наличие TMV результат отрицательный; на наличие ToMV результат отрицательный.

На данный момент исследование продолжается, но уже сейчас можно заключить, что одной из причин сниженного и болезненного урожая в данных областях является заражение фитопатогенными вирусами томатов.

Литература

1. Вирусы томата, особо опасные для овощеводства России / Ю.А. Шнейдер, Е.В. Каримова, Ю.Н. Приходько, Е.Н. Лозовая, Т.С. Живаева // Картофель и овощи. 2021. № 6. С. 3–8. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.25630/PAV.2021.93.45.001>
2. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: ДНК-технология, 2012. 80 с.
3. Ahmad G., Malik S.A., Mahmood Z., Iqbal M.Z., Ahmad S. 2002. Effect of cotton leaf curl virus disease severity on morphology, yield and fiber characteristics of susceptible lines/cultivars of cotton (*G. hirsutum* L.). Asian J. Plant Sci. 1:705-707.

Илициколины сибирских грибов *Corinectria* spp. и их фитотоксичность

Антипова Т.В.¹, Желифонова В.П.¹, Баскунов Б.П.¹, Литовка Ю.А.^{2,3}, Павлов И.Н.^{2,3}

¹ ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), tatantip@rambler.ru

² Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск

³ Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38255

В последние годы в Средней Сибири появилось заболевание *Abies sibirica*, проявляющееся симптомами деформации стебля/ветвей, некрозом камбия и отмиранием ветвей и побегов с последующим развитием на них круглых красных плодовых тел гриба (Pavlov et al., 2020). Выделенные изоляты гри-

ба по морфологическим и молекулярно-генетическим особенностям штаммов были отнесены к роду *Corinectria* Gonzalez & Chaverri (порядок *Hypocreales*, семейство *Nectriaceae*) и генетически были хорошо отделены от других известных видов *Corinectria* (Pavlov et al., 2020). Род *Corinectria* был обособлен от рода *Neonectria* Wollenw в результате современных молекулярно-генетических исследований (Gonzalez, Chaverri, 2017). В стадии анаморфы *in vitro* грибы рода *Corinectria* не формируют макроконидии и хламидоспоры, характерные для представителей рода *Neonectria*. Макроконидии можно обнаружить только в природных условиях. Сибирские штаммы *Corinectria* spp. проявляли фитопатогенные свойства в отношении семян *Picea abies* (L.) Karst., проростков и семян *A. sibirica*, ингибируя ростовые процессы и вызывая обширные некрозы растительных тканей. Было высказано предположение, что в патологическом процессе могут участвовать вторичные метаболиты *Corinectria* spp. Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о вторичных метаболитах грибов *Corinectria*. Для фитопатогенных видов *Nectria* (Fr.) Fr., *Neonectria* и их анаморф известен синтез вторичных метаболитов с выраженным фитотоксическим действием. По химическому строению их относят к меротерпеноидам, сесквотерпенам, тритерпенам, бензохинонам и другим. В связи с этим целью работы было изучение вторичных метаболитов сибирских штаммов *Corinectria* spp., выделенных из язвенных поражений *A. sibirica*, и их фитотоксичности.

Объектом исследования служили 23 штамма грибов рода *Corinectria*, изолированных в чистую культуру в период 2014–2021 гг. на территории Средней Сибири. Методы выделения штаммов из язвенных поражений пихты сибирской и их идентификация описаны в (Pavlov et al., 2020). Штаммы хранятся в коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). По морфолого-культуральным признакам штаммы были разделены на два морфотипа (**МКТ1** и **МКТ2**). Молекулярно-генетические исследования подтвердили наличие двух изолированных групп, что свидетельствует о существовании в Сибирском регионе, предположительно, двух новых видов *Corinectria* spp. (Pavlov et al., 2020).

Спектр вторичных метаболитов штаммов *Corinectria* spp. на основании данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии также был разделен на две группы, которые оказались идентичными группам, выделенным по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам. У штаммов МКТ1 (13 культур) были обнаружены илициколилин А, эпоксиилициколилин А, илициколиновая кислота В и хлороцилиндрикарпол. У штаммов МКТ2 (10 культур) были обнаружены илициколины С и D (аскохлорин), F и аскофуранол. Идентифицированные у сибирских штаммов *Corinectria* spp. соединения относят к меротерпеноидам илициколинового ряда. Илициколины ранее были обнаружены у разных видов фитопатогенных грибов *Nectria*, *Neonectria* и их анаморф. Для илициколинов С, F, E показана антибактериальная, слабая антифунгальная и фитотоксическая активности (Gutierrez et al., 2005; Yu et al., 2019). У штаммов *Corinectria* spp. МКТ1 преобладал эпоксиилициколилин А его доля составляла около 75% от всех илициколинов. У штаммов МКТ2 среди метаболитов преобладали илициколины С и D: 40 и 30% от суммы илициколинов соответственно. Следует отметить, что в процессе биосинтеза эпоксиилициколилин А преобразуется с помощью двух биосинтетических путей. Первый путь ведет к образованию илициколинов С, D и F, второй к аскофуранолу и аскофуранону (Aragi et al., 2019).

Была исследована фитотоксичность смеси илициколинов из МКТ1 и МКТ2 в отношении проростков *A. sibirica* и семян *Picea sibirica*. Установлено, что илициколины из МКТ2 более токсичны в отношении проростков *A. sibirica* – минимальная подавляющая концентрация составила 0.05 мг/мл, тогда как для штамма из МКТ1 этот показатель был существенно выше – 0.2 мг/мл. Для семян *P. sibirica* второго года вегетации наблюдаемый эффект был аналогичен. Илициколины из МКТ2 продемонстрировали более высокую фитотоксичность: массовая гибель растений (от 50 до 87%) отмечена в период с 30 по 40 сут эксперимента при концентрации илициколинов 0.5 мг/мл. При использовании илициколинов из МКТ 1 в концентрации 0.3 мг/мл максимальная гибель семян *P. sibirica* составила 8%. Увеличение концентрации до 0.5 мг/мл привело к гибели 44% семян на 40-е сут.

Таким образом, при изучении вторичных метаболитов у 23 штаммов грибов рода *Corinectria*, выделенных в Средней Сибири из язвенных поражений *A. sibirica*, было обнаружено 8 соединений илициколинового ряда. По спектру вторичных метаболитов штаммы были разделены на две группы. Обнаружена корреляция между морфологическими признаками *Corinectria* и спектром илициколинов. Штаммы из второго морфотипа проявляли более высокую фитотоксичность, поскольку в их метаболическом профиле присутствуют илициколины С и F, для которых известна фитотоксичная активность.

Литература

1. Araki Y., Awakawa T., Matsuzaki M., Cho R., Hoshino Sh., Shinohara Y., et. al. Complete biosynthetic pathways of ascofuranone and ascochlorin in *Acremonium egyptiacum*. 2019. PNAS. V. 116. № 17. 8269–8274.
2. Pavlov I.N., Vasaitis R., Litovka Y.A., Stenlid J., Jankovsky L., Timofeev A.A., Menkis A. Occurrence and pathogenicity of *Corinectria* spp. – an emerging canker disease of *Abies sibirica* in Central Siberia. Scientific Reports. 2020. V. 20. P. 5597.
3. Gonzalez C.D., Chaverri P. *Corinectria*, a new genus to accommodate *Neonectria fuckeliana* and *C. nonstrita* sp. nov. from *Pinus radiata* in Chili. Mycol. Progress. 2017. V. 16. P. 1015–1027.
4. Gutierrez M., Theodulos Cr., Lolas J.R.M., Schmeda-Hirschmann G. Bioactive Metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chili. J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. 7701–7708.
5. Yu H-B., Jiao H., Zhu Y-P, Zhang J-P, Lu X-L, Liu X-Y. Bioactive metabolites from the Arctic fungus *Nectria* sp. B-13. J. Asian Natural Products Research. 2019. V. 21. № 10. 961–969.

Получение накопительных культур бактерий цикла азота из подземных вод с нитратным и радионуклидным загрязнением вблизи шламохранилища АО «ЧМЗ»

Бандурин А.Д.¹, Попова Н.М.¹, Сафонов А.В.¹, Вишнякова А.С.²

¹ Институт физической химии и электрохимии РАН им. А.Н. Фрумкина, lexb179@gmail.com

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38256

Шламоохранилища предприятий добычи и переработки урановой руды приводят к загрязнению подземных вод ураном и макрокомпонентами (нитраты, сульфаты, аммоний), а также тяжелыми металлами. Фильтрация загрязнителей в подземные воды, а в дальнейшем их попадание в источники водоснабжения, распространенная для таких предприятий проблема, требующая инженерного решения. К таким предприятиям можно отнести АО Чепецкий механический завод «ЧМЗ» (г. Глазов, респ. Удмуртия), за более, чем 50-летний период эксплуатации шламоохранилищ в верхнем водоносном горизонте на территории ЧМЗ на сегодняшний день наблюдается серьезный уровень загрязнения подземных вод нитратами, аммонием, сульфатами, ураном, а также разнообразными металлами. Одним из вариантов очистки, наиболее подходящим для удаления азота являются биологические барьеры, которые осуществляются путем нагнетания недорогих растворимых субстратов для активации микробного сообщества, удаляющего азот в процессах денитрификации – восстановления нитрат-ионов до молекулярного азота, нитрификации – (двухстадийного окисления аммония в присутствии кислорода сначала до нитрита, а затем до нитрата), анаммокс-анаэробному восстановлению аммония до молекулярного азота, и сульфатредукции – восстановлению сульфатов до сероводорода. Подобная технология хорошо себя зарекомендовала и активно используется в мире уже несколько десятилетий.

В данной работе проведено получение накопительных культур нитрифицирующих, денитрифицирующих и анаммокс бактерий на питательных средах методом непроточного культивирования. После трехкратного последовательного пересева выделены устойчивые накопительные культуры нитрифицирующих бактерий первой стадии (скорость потребления аммония 49,4 мг/л/сутки), второй стадии (скорость потребления нитрита 52,1 мг/сутки), денитрифицирующих бактерий (скорость потребления нитрата 47,9 мг/л/сутки) и бактерий анаммокс (скорость потребления аммония 14 мг/л/сутки).

На основании данных разнообразия микробного сообщества накопительных культур методом анализа последовательностей генов 16S рРНК установлено, что в накопительной культуре нитрификаторов первой стадии доминировали представители бактерий семейств: *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Rhizobiaceae*. В накопительной культуре нитрификаторов второй стадии доминировали представители бактерий семейств: *Sphingomonadaceae*, *UCG-010*, *Oscillospiraceae*, *Bacteroidaceae*. В накопи-

тельной культуре денитрификаторов доминировали представители бактерий семейств: *Alcaligenaceae*, *Nitrososphaeraceae*, *Campobacteriaceae*. В накопительной культуре анамокс бактерий доминировали представители семейств: *Pseudomonadaceae*, *Rhodanobacteraceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Nitrososphaeraceae*, *Woesearchaeales*.

Таким образом, в составе накопительных культур обнаружены разнообразные представители окислительной и восстановительной ветвей цикла азота, дальнейшее изучение которых перспективно для создания нативных биопрепаратов для интродукции в подземные водоносные горизонты при *in situ* биоремедиации.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ No. 22-24-00701.

Новые подходы в идентификации бактерий рода *Ancylobacter* и реклассификация родов *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylorhabdus*

Белова А.А.¹, Капарулина Е.Н.¹, Агафонова Н.В.¹, Груздев Д.С.², Доронина Н.В.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
chemodurova.alina@mail.ru

² SciBear, Эстония

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38257

В настоящее время род *Ancylobacter*, входящий в семейство *Xanthobacteraceae* порядка *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*, включает 11 валидно описанных видов (<https://lpsn.dsmz.de/genus/ancylobacter>) близких по уровню сходства генов 16S рРНК, физиолого-биохимическим и хемотаксономическим свойствам. Помимо этого представители рода *Ancylobacter* филогенетически и фенотипически родственны с представителями родов *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylorhabdus*.

Интеграция геномной информации в систематику прокариот является одним из основных критериев классификации таксонов, поэтому в данной работе мы провели поиск новых подходов и совершенствование классификации представителей данных родов с использованием современных методов.

Согласно результатам филогенетического анализа, основанного на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК сходство между видами *Ancylobacter*, *Starkeya*, *Angulomicrobium*, *Methylorhabdus* составило 96.2–98.5%, что значительно выше порогового значения в 94.5% для разделения прокариот на уровне рода. Кроме того, на филогенетическом и филогеномном деревьях представители *Ancylobacter*, *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylorhabdus* формируют самостоятельную монофилетическую кладу (значения «bootstrap» >70%) внутри семейства *Xanthobacteraceae*, что также свидетельствует об их близком родстве.

Рассчитанные нами индексы попарного сравнения средней идентичности нуклеотидов (ANI), средней идентичности аминокислот (AAI), процента консервативного белка (РОСР) (табл. 1) и эволюционное расстояние на филогеномном дереве, построенном на основе последовательностей 120 консервативных маркерных генов, выявили высокую корреляцию с результатами филогеномного анализа, и дали основание к объединению родов *Ancylobacter*, *Angulomicrobium* и *Starkeya* в один род.

Кроме того, для проверки внутри- и межродового распределения нами построены графики AAI в сравнении с РОСР (рис. 1). На рис. 1А показано смещение кластеров внутри- и межродовых значений представителей родов *Ancylobacter*, *Angulomicrobium* и *Starkeya*, но при объединении этих родов образовались кластеры с четкими границами (рис. 1В), при этом пороговое значение AAI, предложенное нами для разделения видов рода *Ancylobacter*, составило 72%.

Наряду с анализом геномов, актуален также поиск новых маркеров для быстрой дифференциации организмов без привлечения геномного анализа.

		POCP																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
AAI	1 <i>Ancylobacter moscoviensis</i> 3C	100.0	76.7	77.0	71.0	73.3	73.5	71.3	71.4	69.1	68.3	68.7	71.0	56.0	53.1	55.4	54.5	53.4	54.0
	2 <i>Ancylobacter (Starkeya) novella</i> DSM 506	84.3	100.0	77.1	72.8	74.3	74.1	70.0	71.6	70.8	69.2	68.3	66.8	53.6	53.4	53.7	53.4	52.6	53.5
	3 <i>Ancylobacter (Starkeya) korensis</i> Jip08	83.9	82.4	100.0	73.1	76.1	77.8	69.8	71.0	68.2	66.5	66.8	70.3	56.7	54.1	55.3	53.9	50.8	53.9
	4 <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> VKM B-2484	82.5	81.6	82.8	100.0	76.8	78.5	67.1	69.9	67.7	65.5	64.9	67.9	52.8	54.9	53.6	53.8	54.2	51.6
	5 <i>Ancylobacter aquaticus</i> DSM 101	82.1	80.7	82.2	87.6	100.0	82.7	68.4	71.2	68.8	67.6	67.3	68.6	53.8	52.9	52.2	52.2	49.9	53.0
	6 <i>Ancylobacter rudongensis</i> CGMCC 1.1761	82.2	81.0	82.2	87.4	91.1	100.0	69.1	70.8	68.2	66.6	66.3	70.7	55.1	54.0	54.0	53.2	50.1	53.0
	7 <i>Ancylobacter (Angulomicrobium) tetraedris</i> DSM 58	79.8	79.5	79.2	78.6	78.4	78.9	100.0	71.7	70.4	68.1	71.4	70.2	52.7	52.4	54.1	53.3	52.2	51.7
	8 <i>Ancylobacter pratensis</i> DSM 102029	78.9	78.6	78.5	78.7	78.6	79.2	78.8	100.0	71.1	67.4	69.2	69.5	53.4	53.0	53.7	54.2	53.9	52.4
	9 <i>Ancylobacter defluvii</i> VKM B-2789	76.5	76.8	76.3	76.2	75.7	75.7	76.5	75.9	100.0	80.5	82.3	68.2	53.3	52.7	53.7	54.1	51.8	51.4
	10 <i>Ancylobacter oerskovii</i> CCM 7435	77.1	77.0	76.4	75.9	75.6	75.7	76.5	75.7	87.8	100.0	79.4	65.6	51.5	51.3	53.3	53.0	49.9	50.5
	11 <i>Ancylobacter sonchi</i> VKM B-3145	77.1	76.6	76.4	76.0	75.5	75.8	76.6	76.1	88.0	88.2	100.0	69.0	51.8	51.5	53.7	53.6	51.7	51.0
	12 <i>Ancylobacter lacus</i> VKM B-3280	75.6	74.7	74.6	74.8	74.7	74.7	75.5	74.7	74.3	74.7	74.9	100.0	54.9	54.8	56.8	54.9	53.4	52.0
	13 <i>Aquabacter cavernae</i> Sn-9-2	65.6	65.3	64.7	65.1	64.9	64.8	64.9	64.7	64.6	64.7	64.7	65.3	100.0	71.8	66.4	65.6	58.4	63.1
	14 <i>Aquabacter spiritensis</i> DSM 9035	64.6	64.6	64.5	65.2	64.6	64.7	65.0	64.8	64.0	64.3	64.5	65.2	77.0	100.0	64.2	63.6	59.7	62.9
	15 <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	65.1	64.7	64.3	64.3	63.9	64.5	64.5	64.4	64.0	64.6	64.5	65.2	71.6	71.3	100.0	80.1	60.6	59.5
	16 <i>Azorhizobium doebereineriae</i> UFLA1-100	65.1	64.7	64.5	64.4	64.1	64.6	64.6	64.3	64.4	64.9	64.7	65.6	72.1	71.6	81.7	100.0	62.3	59.7
	17 <i>Xanthobacter autotrophicus</i> DSM 432	65.5	65.1	64.8	65.6	64.4	65.1	65.0	64.8	64.3	64.6	64.8	65.8	71.9	71.0	71.2	71.9	100.0	61.1
	18 <i>Xanthobacter tagetidis</i> ATCC 700314	64.9	64.9	64.4	65.0	64.9	65.0	64.3	64.7	64.1	64.5	64.2	65.0	71.2	71.1	70.0	70.2	75.3	100.0

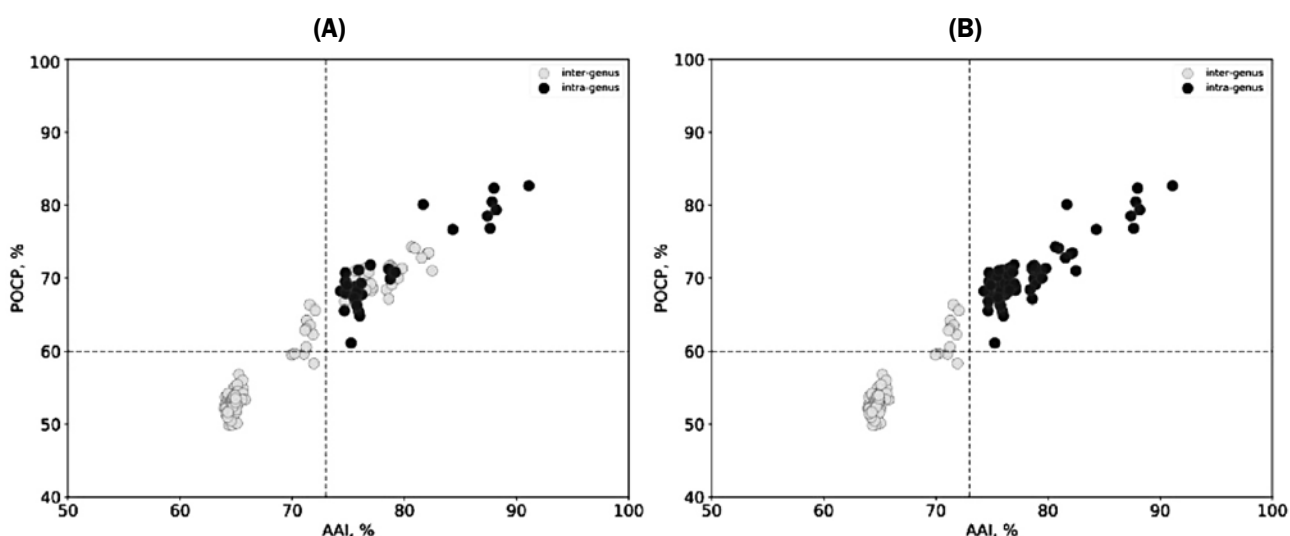


Рис. 1. Значения AAI и POCP внутри- и межродовых распределений в семействе *Xanthobacteraceae* согласно текущей таксономии (А) и таксономии, предложенной в нашем исследовании (В). Предлагаемые значения AAI и POCP для разграничения родов показаны вертикальными и горизонтальными серыми пунктирными линиями

Один из таких методов – МАЛДИ масс-спектрометрия (МАЛДИ-МС), которая существенно облегчает определение систематического положения бактериальных изолятов на уровне рода, вида и подвида у некоторых таксонов. Кластерный анализ масс-спектров с использованием программы BioTyper 3.0 («Bruker Daltonics») и дендрограмма, построенная на основании этих данных, продемонстрировали высокое разрешение метода МАЛДИ-МС для разделения представителей родов *Ancylobacter* и *Starkeya* на видовом уровне. Полученные данные четко согласовались с филогенией по гену 16S рНК, следовательно, метод МАЛДИ-МС может быть успешно применен для предварительной идентификации новых изолятов *Ancylobacter* и *Starkeya* на уровне вида.

Также нами впервые проведен сравнительный филогенетический анализ генов НАД⁺ – зависимых форматдегидрогеназ (НАД⁺–ФДГ), обнаруженных во всех доступных геномах мезофильных родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*. Последовательности белка НАД⁺–ФДГ представителей этих родов выявили уровень идентичности 87.8–98.3%, а расположение представителей этих родов на дереве, построенном на основании сравнения аминокислотных последовательностей НАД⁺–ФДГ, коррелирует с филогенией по гену 16S рНК, поэтому рекомендовано использовать НАД⁺–ФДГ в качестве функционального маркерного гена для дальнейшего поиска и видовой идентификации новых изолятов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*.

Таким образом, полученные результаты филогенетического и филогеномного анализов, расчет геномных индексов (ANI, AAI и POCP) подтвердили, что объединение родов *Ancylobacter*, *Starkeya*, *Angulomicrobium*, *Methylorhabdus* оправдано, и позволяют реклассифицировать *Starkeya novella* как *Ancylobacter novellus* comb. nov., *Starkeya koreensis* как *Ancylobacter koreensis* comb. nov., *Angulomicrobium tetraedrale* как *Ancylobacter tetraedralis* comb. nov., *Angulomicrobium amanitiforme* как *Ancylobacter amanitiformis* comb. nov. Сильная позиция Mrh. multivorans DM13^T в составе *Ancylobacter* в филогенетическом дереве по гену 16S рРНК дает основание также реклассифицировать *Methylorhabdus multivorans* как *Ancylobacter multivorans* comb. nov. Кроме того, нами впервые предложены новые подходы, позволяющие эффективно дифференцировать представителей рода *Ancylobacter* на видовом уровне (использование МАЛДИ-МС анализа и НАД⁺-ФДГ в качестве функционального маркерного гена).

Популяционная структура и спектр аллельных мутаций *M. tuberculosis*, определяющих лекарственную чувствительность к антибактериальным препаратам в Ростовской области

Бережной С.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –
МВА им. К.И. Скрябина, Москва,
serberezhnoy@sfedu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38258

Различные географические регионы имеют разнообразную популяционную структуру возбудителей туберкулеза для некоторых из них есть основная линия, для которой характерно наименьшее распространение в других регионах. Штаммы *M. tuberculosis Beijing* широко распространены по всему миру и ассоциированы с лекарственной резистентностью.

Цель исследования

Оценка популяционной структуры и спектра аллельных мутаций, определяющих лекарственную чувствительность к антибактериальным препаратам в штаммах *M. tuberculosis*, выделенных у жителей Ростовской области.

Материалы и методы

Исследованы 96 образцов ДНК *M. tuberculosis* от больных туберкулезом, мужчин – 74 (77%) и женщин – 22 (23%), с различными клиническими формами: инфильтративная 47 (48,9%), диссеминированная 49 (51,1%), жителей Ростовской области. Пациенты находились на стационарном этапе лечения в ГБУ РО «Областной клинический центр фтизиопульмонологии» в 2021 г. Для выделения ДНК возбудителей туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, а также изучению популяционной структуры *M. tuberculosis* применяли наборы «Амплитуб-РВ», «Амплитуб-МЛУ-РВ», «Амплитуб-FQ-РВ», «Амплитуб-Beijing» (ООО «Синтол», Россия). PCR Real Time проводили с применением детектирующего амплификатора ДТ-прайм (ООО «ДНК-технология», Россия).

Основные результаты

Среди пациентов, инфицированных возбудителями туберкулеза 60 (62,5%) случаев относились к группе *M. tuberculosis Beijing* и 36 (37,5%) штаммов к группе *M. tuberculosis non-Beijing*. В группе *M. tuberculosis Beijing* наличие мутаций не выявлено для 11 (18,4%) штаммов. Выявленные мутации оп-

ределяющие чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов Beijing распределились следующим образом: устойчив к изониазиду ген katG замена S315T (agc-aCc) 10 (16,7%) образцов; устойчив к рифампицину и изониазиду сочетанные мутации в генах groB S531L (tcg-tTg) и katG S315T (agc-aCc) 22 (36,6%) штаммов; устойчив к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам сочетанные мутации в генах groB S531L (tcg-tTg), katG S315T (agc-aCc), gyrA A90V (gcg-gTg) 17 (28,3%) штаммов. В группе *M. tuberculosis non-Beijing* наличие мутаций не выявлено для 23 (64%) штаммов. Выявленные мутации определяющие чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов non-Beijing распределились следующим образом: устойчив к изониазиду ген katG замена S315T (agc-aCc) 5 (14%) образцов; устойчив к рифампицину и изониазиду сочетанные мутации в генах groB S531L (tcg-tTg) и katG S315T (agc-aCc) 6 (16,5%) штаммов; устойчив к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам сочетанные мутации в генах groB S531L (tcg-tTg), katG S315T (agc-aCc), gyrA D94G (gac-gGc) 2 (5,5%) штаммов.

Выводы

В Ростовской области выявлен высокий уровень распространенности штаммов семейства *M. tuberculosis Beijing* 62,5% ассоциированных с лекарственной резистентностью 81,6%.

Оценка биоремедиационного потенциала прибрежной зоны бассейна реки Оки в отношении антропогенного загрязнения

Вершинина Д.Д.^{1,2}, Ветрова А.А.¹, Иванова А.А.¹, Стрелецкий Р.А.³, Сазонова О.И.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
dina-20002001@mail.ru

² Пушинский естественно-научный институт

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38259

Загрязнение водных бассейнов рек вследствие антропогенных воздействий может привести к серьёзным экологическим и экономическим последствиям. Основными источниками загрязнения рек являются сточные воды предприятий химической, машиностроительной, пищевой, текстильной промышленности, жилищно-коммунального хозяйства, а также водный транспорт. Сброс неочищенных или частично очищенных сточных вод, а также сток с поверхности суши приводит к загрязнению рек и их пойм тяжелыми металлами и/или стойкими органическими загрязнителями. Это может вызвать не только деградацию гидробиоценозов и снижение продуктивности водных ресурсов, но и ухудшение здоровья населения. Реки Волжского бассейна, в частности Ока, испытывают высокую антропогенную нагрузку. Несмотря на то, что река Ока подвергается высокой нагрузке по всей своей длине, именно в пределах Московской области (в среднем течении) антропогенное воздействие является наибольшим. Донные отложения (седименты) являются индикатором экологического состояния водоема, поскольку аккумулируют загрязнения, поступающие в водный бассейн. Это в свою очередь приводит к изменению структуры микробных сообществ, развитию микроорганизмов устойчивых к поступающему загрязнению и т.д. Поэтому при экологической оценке гидроекосистем одним из наиболее информативных объектов изучения являются именно донные отложения.

Для отбора проб седиментов были выбраны 7 сайтов вдоль русла реки Оки в районе городов Серпухов и Пушкино: до впадения реки Протва (№ 1), перед г. Серпухов (до впадения реки Нара) (№ 2), после г. Серпухов рядом с железнодорожным мостом (№ 3), три района с интенсивным земледелием (№ 4, № 5 и № 6, причем сайт № 5 находился рядом с автострадой) и в 2 км вниз по течению от г. Пушкино (№ 7). В качестве контрольной области предположительно минимального антропогенного воздействия была выбран сайт до впадения реки Протва (№ 1). Пробы седиментов из каждого сайта были отобраны

в сентябре 2022 г. из трех точек в 1 м от береговой линии под слоем воды 25–30 см. Полученные пробы были тщательно перемешаны для получения усредненных образцов. Температура воды на момент отбора составляла +7 °С. Общая численность культивируемых микроорганизмов во всех пробах была сходной и составляла $1.86 \cdot 10^7 - 6.98 \cdot 10^7$ КОЕ/г, за исключением образца № 5, где численность была на порядок выше и составляла $2.1 \cdot 10^8$ КОЕ/г. Высевы на минеральную агаризированную среду Эванса (Е-агар), содержащую дизельное топливо в качестве источника углерода и энергии позволили определить численность культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов в отобранных донных отложениях. Для образцов № 1, № 3, № 5 и № 7 данный показатель составлял $1.8 \cdot 10^5 - 2.65 \cdot 10^5$; численность культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов для № 2, № 4 и № 6 была $2.65 \cdot 10^4 - 4.26 \cdot 10^4$. Таким образом, низкая численность углеводородокисляющих микроорганизмов в образцах донных отложений сайтов № 2, № 4 и № 6 может свидетельствовать об отсутствии (или низком уровне) загрязнения русла реки Оки в данных районах продуктами переработки нефти.

Оставшаяся часть образцов седиментов была заморожена для проведения химического анализа, который позволит установить тип загрязнителя/загрязнителей (в том числе образцы будут исследованы на наличие тяжелых металлов, удобрений, инсектицидов и гербицидов, используемых в агрохимии) в каждом образце и его/их количество. Результаты исследования речных донных отложений позволят установить наиболее неблагоприятные в экологическом отношении участки реки в районе городов Серпухов и Пушкино. Полученные данные будут иметь большую практическую значимость, поскольку позволят скорректировать состав программы мониторинга речного бассейна.

Разнообразие бактериальных сообществ районов г. Мурманска, отличающихся уровнем антропогенной нагрузки и степенью загрязнения ПАУ и металлами

Ветрова А.А.¹, Сазонова О.И.¹, Иванова А.А.¹, Корнейкова М.В.^{2,3}, Стрелецкий Р.А.⁴, Новиков А.И.⁵, Слуковская М.В.^{2,5}, Гавричкова О.В.^{2,6}

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
phdvetrova@gmail.com

² Российский университет дружбы народов, Москва

³ Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, Апатиты

⁴ Московский государственный университет, Москва

⁵ Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева
(ИХТРЭМС КНЦ РАН), Апатиты

⁶ Научно-исследовательский институт наземных экосистем,
Национальный исследовательский совет, Порано, Италия, olga.gavrchkova@cnr.it

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38260

Актуальность изучения полярных регионов постоянно возрастает в связи с быстрой и чувствительной реакцией арктических экосистем на глобальное изменение климата. В последнее время резко возросло антропогенное влияние в полярных широтах, что привело к неизбежному увеличению загрязнений техногенного характера.

Мурманск – самый большой город в мире за Полярным кругом. Несмотря на то, что был утвержден курс на внедрение возобновляемых источников энергии странами Арктического совета в регионе, Мурманск остается одним из немногих крупных городов России, где тепловые электроцентралы и котельные до сих пор используют мазут. Известно, что распределение различных загрязнителей в воздухе (полициклические ароматические углеводороды – ПАУ, тяжелые металлы и т.д.) крупных городов отличается по качественному и количественному составу в зависимости от районов. Самые высокие концентрации

загрязняющих веществ, как правило, обнаруживаются в промышленных районах и районах с высокой транспортной нагрузкой. Адсорбируясь на твердых частицах пыли, загрязнители оседают на запечатанных поверхностях (асфальт, бетонные покрытия и т.д.) и поверхностях листьев. Цель исследования заключалась в выявлении факторов, которые в наибольшей степени влияют на структурное разнообразие бактериальных сообществ пыли с запечатанных поверхностей и листьев в трех городских районах Мурманска с контрастной антропогенной нагрузкой.

Отбор пыли из двух экотопов – поверхность асфальта и листовые пластинки *Betula pubescens* Ehrh. – проводили в Мурманске в июле 2021 года. Поскольку пространственная структура городов имеет функциональное зонирование, определяющее степень антропогенного воздействия на экосистемы, то отбор проб проводили в следующих зонах: рекреационная (68.941098 N, 33.119497 E), селитебная (68.978944 N, 33.093556 E) и зона интенсивного дорожного движения (68.960117 N, 33.064084 E). Отобранные образцы использовали для микробиологического профилирования бактериальных сообществ и химического анализа на содержание ПАУ и металлов.

Оценку количества углеводородов в образцах пыли проводили методами газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что общее количество ПАУ было в 10 раз выше в пыли, собранной с листьев (в пересчете на 1 г пыли) в сравнении с пылью с асфальта. Отмечалось снижение общего количества ПАУ и их разнообразия в градиенте антропогенного загрязнения от зоны интенсивного дорожного движения к рекреационной зоне как в образцах с асфальта, так и в образцах с листьев. Кроме того, концентрации отдельных углеводородов, в частности хризена, антрацена, бенз[а]нтрацена и флуорантена, снижались в направлении от зоны трафика к рекреационной зоне в обоих экотопах. Следует отметить, что количество пирена снижалось в этом направлении только в пыли с асфальта, в пыли с листьев наблюдалась обратная тенденция. Увеличение содержания нафталина также было отмечено в направлении от зоны трафика к рекреационной зоне но только для пыли с листьев.

Четкий антропогенный градиент увеличения содержания металлов в образцах пыли с асфальта от рекреационной зоны к зоне трафика прослеживался для K, Al, Mg и Si. Для образцов пыли с листовых пластинок наблюдался межзональный градиент следующих металлов: K, Na, Ca, Zn и Ti. Для других металлов четкого антропогенного градиента не прослеживалось.

Состав бактериальных сообществ был проанализирован методом высокопроизводительного секвенирования области V3-V4 региона гена 16S рРНК. Для бактериальных сообществ пыли с асфальта был идентифицирован 31 тип, 78 классов и 182 порядка. Для бактериальных сообществ пыли с листьев было идентифицировано 26 типов, 73 класса и 185 порядков. Во всех исследуемых образцах было обнаружено 4–5 доминирующих типов, причем типы *Proteobacteria* (23–34% преобладающий тип), *Actinobacteria* (4–26%) и *Cyanobacteria* (2–10%) были общими доминирующими типами для обоих экотопов. Интересно, что *Bacteroidetes* (9–12%) был еще одним доминирующим типом в образцах пыли с асфальта, в то время как *Firmicutes* (7–13%) – в пыли с листьев. В рамках *Proteobacteria* большинство флотипов были представлены альфапротеобактериями (характерно для обоих экотопов), бетапротеобактериями (в образцах с асфальта) и гаммапротеобактериями (в образцах пыли с листьев).

Удаленность от зоны интенсивного дорожного движения влияла на относительную представленность отдельных членов исследуемых бактериальных сообществ, причем в большей степени это относилось к сообществам пыли с листовых пластинок. Так, на уровне бактериальных типов наблюдалось снижение от зоны интенсивного дорожного движения к рекреационной зоне относительной представленности для 13 из 26 идентифицированных типов, в то время как для образцов пыли с асфальта этот показатель составлял 1 из 31.

Для выявления взаимосвязи между изменением относительной представленности обнаруженных типов бактерий и концентрациями различных ПАУ и тяжелых металлов был использован анализ избыточности (RDA). RDA и последующая линейная регрессия подтвердили, что бактериальные типы с относительной представленностью более 0,1% действительно коррелируют с изменением количества ПАУ в окружающей среде.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, номер проекта: 19-05-50112.

Определение численности стрептомицетов из разных почв и выделение их в чистую культуру

Гембицкая Е.А.

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»,
Институт биологии и биотехнологии, г. Киров,
ekgemba@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38261

Стрептомицеты являются самым крупным родом актиномицетов. Их основным местом обитания является почва. Они синтезируют примерно 2400 уникальных соединений различного состава, в частности, большинство антибиотиков, противоопухолевых, противовирусных и антипаразитарных соединений, ферментов, гормонов, витаминов и других веществ. Антибиотики являются незаменимыми в борьбе с бактериальными инфекциями, поэтому стрептомицеты представляют большой интерес для ученых, работающих в области микробиологии, биохимии, биотехнологии [1].

Цель данной работы – определение общей численности прокариотных микроорганизмов и численности стрептомицетов, выделение их в чистую культуру. Для исследования были использованы образцы дерново-почвы 13 и 15. Основные питательные среды, применяемые для культивирования стрептомицетов: казеин-глицериновый агар, овсяный агар [2].

Навески почвенных образцов массой 1 г перед исследованием прогревали при 100 °С в течение 1 часа. Было приготовлено 0,5 л казеин-глицеринового агара, который затем разлили в 24 чашки Петри (12 чашек без добавления антибиотика и 12 чашек с антибиотиком тобромицином). Затем были приготовлены почвенные суспензии образцов почв 13 и 15 путем растирания почвы в ступке с небольшим количеством стерильной воды и переносом почвы в пустую стерильную колбу; после было приготовлено последовательное разведение из этих суспензий до 10^{-4} каждого образца. Высев на казеин-глицериновый агар производили из разведений 10^{-3} и 10^{-4} в трехкратной повторности поверхностным методом по 0,1 мл в каждую чашку Петри и растирали шпателем досуха. Инкубация при 28 °С 5–7 суток. После этого производили подсчет общей численности микроорганизмов и численности стрептомицетов на чашках Петри (табл. 1).

Таблица 1

Результаты подсчета общей численности КОЕ на КГА без антибиотика

Показатель	Номер образца и разведения			
	13^{-3}	13^{-4}	15^{-3}	15^{-4}
Количество колоний на чашках Петри (стрептомицетов)	100 (9)	10 (4)	213 (32)	79 (23)
	131 (6)	22 (3)	219 (35)	64 (10)
	73 (11)	11 (6)	240 (13)	66 (13)
Общая численность прокариот ± стандартное отклонение, тыс. КОЕ/г	1013,33±290,23	1433,33±665,83	2240±141,77	6966,67±814,45
Численность стрептомицетов, тыс. КОЕ/г	86,67	433,33	266,67	153,33
Доля стрептомицетов в прокариотном комплексе, %	8,5	30	11,9	22

Антибиотик подавил рост микроорганизмов на казеин-глицериновом агаре и стрептомицетов обнаружено не было. По полученным данным таблицы видно, что наибольшая общая численность на КГА без антибиотика обнаружена в образце 15^{-4} , а наибольшая общая численность стрептомицетов обнаружена в образце 15^{-3} . Наибольший процент стрептомицетов на КГА без антибиотика обнаружен в образце 13^{-4} , что составляет 30% от общего числа микроорганизмов, выросших на чашках Петри.

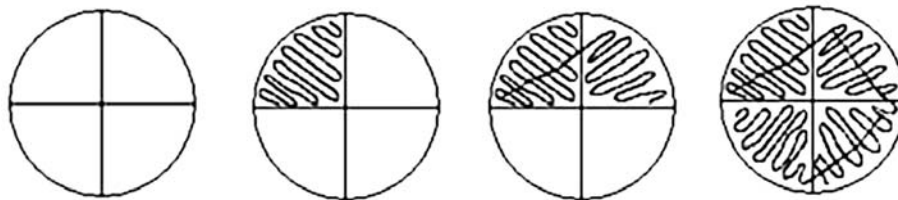


Рис. 1. Метод истощающего штриха секторами [3]

Для выделения стрептомицетов в чистую культуру их колонии с чашек Петри на казеин-глицериновом агаре пересеивали истощающим штрихом секторами на овсяный агар (рис. 1). Для этого чашки Петри с агаризованной средой делили на 4 сектора, затем микробиологической петлей с культурой в первом секторе проводили штрих, прокаляли петлю и делали штрих во втором секторе. Такие же действия проводили для 3 и 4 секторов [3]. Инкубация при 28 °С 5–7 суток.

Если не удавалось выделить чистую культуру на каком-то из секторов, то стрептомицеты пересеивали на отдельную чашку Петри истощающим штрихом. Далее стрептомицеты с овсяного агара пересеивали в пробирки с косым овсяным агаром и инкубировали при 28 °С 5–7 суток. Было пересеяно 24 колонии стрептомицетов. Пробирки с косым агаром были завернуты в пакет, подписаны и помещены в холодильник.

Выделенные чистые культуры стрептомицетов могут быть использованы в дальнейших исследованиях. Появление резистентности микроорганизмов к антибиотикам считается глобальной проблемой, в результате появляется разнообразие генов устойчивости к антибиотикам в почвах. Именно поэтому в дальнейшем планируется изучение распространенности антибиотикорезистентности в почвах с разным антропогенным влиянием.

Литература

1. Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс) [Текст] / Березюк Ю. / Кишенев, 2019. С. 17–33.
2. Биричевская Л.Л. Влияние состава питательной среды и условий культивирования на продуцирование фосфолипиды D культурой *Streptomyces netropsis* БИМ В-235 / Л.Л. Биричевская, А.И. Зинченко [Текст] // Институт микробиологии НАН Беларуси, 2017. С. 1–3.
3. Безуглова А.М. Выделение чистой культуры и ее идентификация / А.М. Безуглова [Текст] // Новосибирский государственный университет, 2007. С. 1–4.

Многослойные перцептронные и когнитронные модели морфогенеза цианобактериальных матов и биоминерализации строматолитов

Градов О.В.

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (ФИЦ ХФ РАН),
 Отдел динамики химических и биологических процессов,
 gradov.chph.ras@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38262

В настоящем докладе рассматривается семейство вычислительных моделей роста и развития цианобактериальных матов и формирования слоистых строматолитов, родолитов и стириолитов, разработанное автором во время работы в ГЕОХИ РАН в 2010–2011 гг. Для данных моделей характерны следующие отличительные черты:

I. Референсная модель многослойного цианобактериального мата, включающая в себя: Inputs – светочувствительный аэробный слой из фотосинтезирующих цианобактерий и аэробных гетеротрофов,

утилизирующих кислород, выделяемый первыми); Weights (в минимальной модели) или Hidden Layers (в модели многослойного перцептрона) – промежуточный слой, включающий факультативно анаэробные фотосинтезирующие организмы, переключаемые из аэробного в анаэробное состояние (адекватно весовым функциям и согласно наличию-отсутствию входного фотосинтетического сигнала на надлежащем слое, Input Layer); Output Layer – афотическая гетеротрофная анаэробная область биоминерализации; итоговым продуктом является образование строматолита при биоминерализации – как финальная часть процесса распознавания образов света-затемнения и обработки вторичных редокс-сигналов с разными Activation Functions.

II. Модель в целом имеет иерархическую многослойную организацию и формируется на основе принципов самоорганизации. Локальные контакты между клетками из разных слоёв формируются конкурентным путём. Отметим, что функционально аналогичные модели организации чувствительных к оптическому излучению слоистых структур, в разных слоях которых реализуемы различные формы обработки входящего светового сигнала и продуктов его конверсии, характерны для моделей организации зрительной коры на базе конгитронов и неоконгитронов. Многослойная модель функционирует в модальности многослойного перцептрона Розенблатта (Multilayer Perceptron), или его аналогов, указанных выше.

III. Существенным приближением к образраспознающей функции фотоперцептрона или конгитрона является возможность спектрально- или гиперспектральной адаптации (сенсбилизации) в процессах поглощения оптического излучения. В этом случае также срабатывают изменения весов или Activation Functions промежуточного слоя, поскольку фотосинтезирующие пигменты фотосинтезирующих бактерий в нём, имеющие максимумы поглощения в спектральных диапазонах, отличных от спектра поглощения цианобактериального хлорофилла, обеспечивают Adaptive Tuning в сети, приводя к рефрактерности слоёв (с учётом циркадианного периодического «красного смещения» при изменении энергетического спектра освещённости и фототактических вертикальных миграциях бактерий с различными спектрами поглощения пигментов). Сам факт спектрального различия времён суток, а также освещения от затемнения, есть распознавание образов (спектров) и, возможно, их классификация. Отображение рецептивного поля S-элементов (цианобактериальных клеток) из фотосинтетического слоя на ассоциативное поле A-элементов подлежащего слоя само по себе относится к понятию о «работе» многовидовой сети сообщества как многослойного перцептрона.

IV. Внешние диффузионные связи клеток одного слоя, обеспечивающие quorum sensing в реакционно-диффузионных процессах морфогенеза строматолита, моделируются как связи на эквивалентном логическом расстоянии в перцептронах с латеральными или, тождественно, перекрёстными связями, которые нередко рассматриваются как класс рекуррентных нейронных сетей. Принципиальным моментом являются рефрактерное состояние и устойчивость «самоподдерживающейся», непрекращающейся активности сети. В силу этого, проблемой является подбор сети, которая способна генерировать колебания, адекватные перестройке спектральной чувствительности промежуточного слоя в вертикальной миграции бактерий с разными спектрами поглощения пигментов (автоматизм пространственной модуляции спектрального состава, как в дефлекторах и спектральных фильтрах, актулируемых акустическими и электрическими сигналами в адаптивной оптике; формальные основания модели, в пренебрежении физическими свойствами управляющего сигнала модуляторов, те же). Выбор сетей с устойчивыми и колебательными режимами для моделирования биогеофизики цианобактериальных матов (динамического равновесия структур) и биоминерализации строматолитов (как необратимой тафономической фазы) – неизбежная задача для любых типов моделей с эмерджентными свойствами на основе замкнутых сетей – учитывающих зависимость от последовательности предшествующих состояний (i.e. «эридитарных» моделей).

V. Перцептронные модели 2010–2011 гг. (например, «Stromatron-SA» для строматолитов, кроме тромболитов) сформулированы в максимально общей форме, так как объектом распознавания образов или сигналом может являться, *de facto*, не только свет Солнца, но также и переключение редокс-процессов в промежуточном слое или минеральные процессы в нижнем слое. То есть каждый из слоёв является конвертером сигнала (для передачи на нижележащий слой) в новую форму. Коннективизм при этом продолжит работать, так как связность сети (как в коннектоме) вплоть до фаз биоминерализации, приводящих к скелетным строматолитам с кальцифицированными нитями цианей, не перестает иметь место. В силу конвертерного подхода, весовые коэффициенты могут существенно варьировать-

ся в конвертирующих слоях, а сигналы входа не являются, в строгом смысле слова, бинарными (свет-ть), а зависят от коэффициента конверсии, кодируемого произвольными десятичными числами. При этом функция активации, в силу известной формы чувствительности подобных биофизических систем, способна, в частности, быть сигмоидальной. Таким образом, для конвертирующих моделей, как правило, более адекватной являются граничные условия или нотации многослойного перцептрона Румельхарта (частный случай перцептрона Розенблатта, в котором один алгоритм обратного распространения ошибки обучает все слои; из этого следует, что в многослойных конвертирующих цианобактериальных матах отбор может являться следствием обратных связей между конвертирующими слоями, ведущих к фиттингу параметров соответствующих клеточных элементов-конвертеров (разных таксонов)). Эволюционный подход к «Строматронам» (строматолитным перцептронам) говорит о возможности обучения промежуточных слоёв в трёхмерной многослойной сети, чему соответствует постепенное 3D нарастание новых и переобучение замещаемых слоёв; таким образом, задачи филогенеза, морфогенеза и биоминерализации сведены здесь в одну задачу (что имеет формальные аналогии в некоторых моделях гетероэпитаксии, темплатного синтеза и стратифицированных материалов в аддитивных технологиях). Многослойные цианобактериальные строматроны могут обладать функциональными преимуществами в формате перцептрона Румельхарта только в эволюционном ключе (“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution” Т. Добжанского), когда в ответ на регуляторные хронобиологические стимулы (тидальные, фотосинтетические) не только выполняется ситуативная физиолого-биохимическая реакция, но и ведётся повышение эффективности выработки данной реакции в эволюции через обучение. В связи с этим: можно считать перечисленные «строматронные» модели биологически-правдоподобными на всех масштабах времен – от физиологии до эволюции матов.

Исследование биологических свойств деградированных почвенных экосистем Астраханского региона

Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Аникина Е.А., Бударова В.Ю., Братилова Д.М.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева»,
lilyagrigoryan90@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38263

Актуальной является проблема поиска новых штаммов микроорганизмов, продуцирующих биологически активные вещества с широким спектром экологического влияния, обладающих полифункциональными свойствами, которые могут быть основой новых биопрепаратов [3]. Исследования показывают, что одним из условий получения высокоэффективных биопрепаратов является наличие активных и стабильных штаммов-продуцентов, поэтому очевидна необходимость знания их биологических особенностей: культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, изменчивости, жизнеспособности, целевой активности [1, 5]. Многие исследования, связанные с изучением деградированных почв, дают основание утверждать то, что самыми распространенными микроорганизмами в них являются представители актинобактерий, изоляты которых абсолютно адаптированы к высоким показателям температуры, концентрации солей и радиации. Таким образом, расширение сведений об объеме и разнообразии микроорганизмов экстремальных мест обитания, их месте среди прочих микробов, населяющих почву, развивает наши представления о них, как продуцентах специфических биологически активных веществ и вызывает огромный интерес к их исследованию [2].

Проведены микробиологические исследования 62 почвенных образцов, отобранных из различных деградированных почвенных биотопов Астраханской области. Отобраны почвенные образцы, проведены исследования по изучению общего микробного числа, фитотоксичности и азотфиксирующей актив-

ности. Фитотоксичность почвенных образцов изучена методом ингибирования роста корня редиса [4]. Наличие ингибирующего эффекта выявляли, сравнивая всхожесть семян и длину корня в контрольных и опытных вариантах. Анализ полученных данных показал, что всхожесть выявлена в 15 из 62 образцов, что свидетельствует о токсическом действии исследуемых почв.

Определена азотфиксирующая активность исследуемых проб. Изучение интенсивности азотфиксации в конкретных местообитаниях азотфиксирующих микроорганизмов необходимо для выяснения размеров поступления биологического азота в почвы разных типов. Активность азотфиксации является одним из интегральных показателей биологической активности почв и поэтому широко используется для ранней диагностики загрязненности почв тяжелыми металлами, ядохимикатами, ксенобиотиками, применяется при санитарно-гигиеническом нормировании токсических веществ в почве. Данный показатель может быть информативен при оценке пространственной и временной неоднородности почв.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что азотфиксирующая активность установлена в 7 из 62 проб. Для дальнейших исследований 5 изолятов бактерий р. *Azotobacter* были выделены в чистые культуры. Проведены лабораторные опыты по определению биологической эффективности выделенных штаммов почвенных актинобактерий в отношении фитовирусов. Результаты исследований показали сдерживание развития вирусной инфекции и предотвращение распространения фитоинфекций. Результаты, полученные нами на данном этапе изучения деградированных почв Астраханского региона, вызывают огромный интерес для проведения дальнейших комплексных научных опытов. Расширение сведений об объеме и разнообразии микроорганизмов экстремальных мест обитания, их месте среди прочих микробов, населяющих почву, развивает наши представления о них, как продуцентах специфических биологически активных веществ – потенциальной основы для создания высокоэффективных биопрепаратов для борьбы с деградацией почвенных экосистем на Юге России.

Работа выполнена в рамках реализации проекта «Разработка экологически безопасного средства защиты растений на основе почвенных актинобактерий для восстановления агроэкосистем» по Программе развития Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева на 2021–2030 годы («Приоритет 2030»).

Литература

1. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Яковлева Л.В., Шляхов В.А. Микробиологический состав засоленных почв аридных территорий // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». 2018. № 12. С. 6–14.
2. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Шляхов В.А., Андреева Е.Д., Егоров М.А. Оценка биологической эффективности бактерий *Streptomyces* sp., выделенных из засоленных почв аридной зоны, в отношении возбудителей вирусных болезней картофеля // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». 2018. № 12. С. 14–22.
3. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Шляхов В.А. Влияние штамма бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM 04697 на фитостимуляцию, фитовирусы томата и насекомых-вредителей в лабораторных условиях // Естественные и технические науки. 2020. № 6 (144). С. 58–61.
4. Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю. Биологические методы в оценке токсичности отходов и почв // Казань: Казанский университет. 2011. 96 с.
5. Grigoryan L.N., Bataeva Y.V., Andreeva E.D., Zakar'yaeva D.Kh., Turaeva Z.O. Study of the component structure of the metabolites of bacteria *Nocardiosis umidischolae* in the search for eco-friendly plant protection agents // Russian Journal of General Chemistry. 2020. No 90 (13). P. 2531–2541.

Разнообразие и представленность микробиоты цикла серы в условиях техногенной нагрузки на поздних стадиях почвообразовательного процесса

Дёмин К.А., Горовцов А.В., Сушкова С.Н.

Южный федеральный университет,
Академия Биологии и Биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38264

Метагеномика привнесла масштабные изменения в область исследований микробных сообществ. Это коренным образом повлияло на наше понимание разнообразия микроорганизмов в окружающей среде. Знания глобальных биогеохимических циклов также претерпели изменения, поскольку появилась возможность детектировать новые таксоны, ассоциированные с циклами элементов, а также «видеть» и учитывать скрытые циклы с участием транзитных форм тех или иных элементов. Тем не менее, в изучении циклов наблюдается перекоп: существует значительное количество исследований цикла серы морских экосистем, однако исчерпывающей картины, включающей наземные и антропогенно-преобразованные экосистемы, нет [1]. В данной работе метагеномным методом было исследовано разнообразие микробиоты цикла серы в такой среде. Объектом исследования послужили почвы высохшего озера Атаманское, расположенного в Ростовской области. С 1960-х до середины 1990-х годов большая часть промышленных отходов химического производства аккумулировалась в его донных отложениях, где последние два десятилетия происходит почвообразовательный процесс, а сами почвы имеют чрезвычайно высокие уровни загрязнения тяжёлыми металлами (ТМ) и полиароматическими углеводородами (ПАУ) [2]. Кроме того, в донных отложениях содержится большое количество сероуглерода и сульфатов. Было отобрано 15 образцов почв: 4 контрольных (Fluvisol) и 11 с территории озера (Spolic Technosol). Из образцов почв экстрагировалась тотальная ДНК набором FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, UK). Амплификации подвергался регион V3-V4 гена 16S рНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) в центре коллективного пользования Казанского федерального университета. Фильтрация сырых прочтений ДНК и таксономическая аффилиация проводились в программном обеспечении Mothur. Для визуализации использовался язык программирования R (v 4.2.1).

В табл. 1 представлены все выявленные в контрольных и опытных образцах рода, ассоциированные с двумя основными этапами цикла серы.

Таблица 1

Рода, ассоциированные с циклом серы, выявленные метагеномным анализом

Окислители соединений серы		Восстановители соединений серы	
Контроль	Атаманское	Контроль	Атаманское
<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>Desulfosporosinus</i>
<i>Alicyclobacillus</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	<i>Desulfallas</i>	<i>Desulfallas</i>
<i>Sulfuriferula</i>	<i>Sulfuriferula</i>	<i>Desulfofarcimen</i>	<i>Desulfofarcimen</i>
<i>Sulfobacillus</i>	<i>Sulfobacillus</i>	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>Desulfitobacterium</i>
<i>Sulfuricaulis</i>	<i>Sulfuricaulis</i>	<i>Desulfocucumis</i>	<i>Desulfocucumis</i>
<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Desulfotomaculum</i>
<i>Thiomicrospira</i>	<i>Sulfurivermis</i>	<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Desulfuromonadales</i>
	<i>Sulfuricurvum</i>	<i>Dethiosulfatibacter</i>	<i>Dethiosulfatibacter</i>
	<i>Sulfurovum</i>		<i>Desulfomonile</i>
	<i>Sulfuritalea</i>		<i>Desulfomicrobium</i>
	<i>Sulfuricella</i>		<i>Desulfobacca</i>
	<i>Acidiferrobacter</i>		<i>Desulfovirga</i>

Окислители соединений серы		Восстановители соединений серы	
Контроль	Атаманское	Контроль	Атаманское
	<i>Acidithiobacillus</i>		<i>Desulfonispora</i>
			<i>Desulfococcus</i>
			<i>Desulfonatronum</i>
			<i>Desulfosporomusa</i>
			<i>Desulfatiglans</i>
			<i>Desulfuromonas</i>

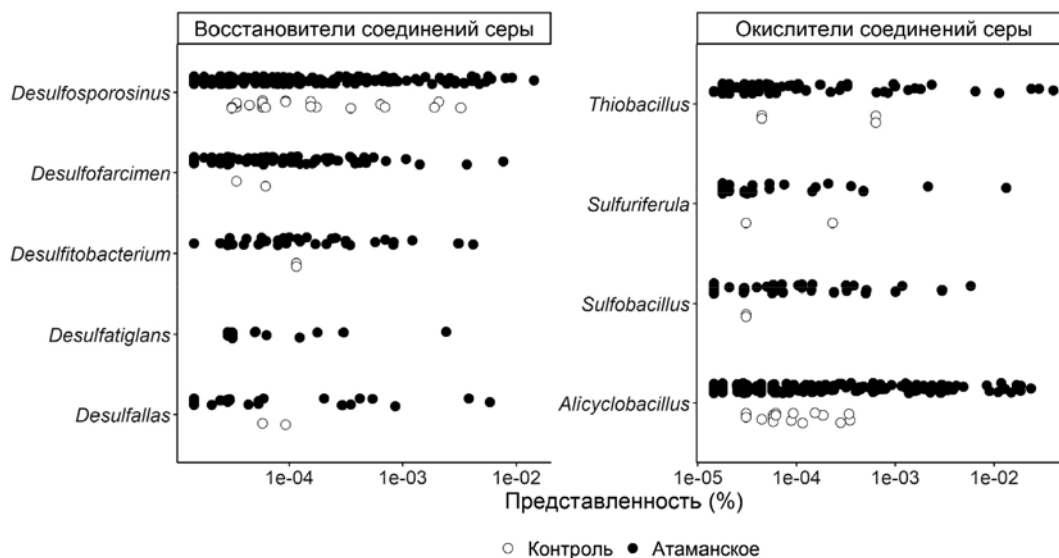


Рис. 1. Рода окислителей и восстановителей серы, значительно различающиеся между исследованными группами почв. Точки представляет копии гена 16S рРНК, аффилированную с соответствующим родом

В сравнении с контролем, почвы территории бывшего озера характеризуются большим разнообразием родов. Для сравнения численности родов в исследуемых группах был проведён тест Вилкоксона. На рис. 1 даны рода, значительно различающиеся ($p < 0,05$) между контролем и почвами озера.

Можно заметить, что в почвах Атаманского представлено большее родовое разнообразие, количественно превышающее таковое в контроле. Кроме того, некоторые рода (*Desulfosporosinus*, *Thiobacillus*, *Alicyclobacillus*) составляют более 1% от всего сообщества. Учитывая, что многие окислители серы устойчивы к ТМ, а сульфатредукторы способны окислять ПАУ и осаждать ТМ в виде сульфидов [3], можно заключить, что цикл серы и опосредующие его микроорганизмы, видимо, являются важным экологическим компонентом, поддерживающим и формирующим микробное сообщество Атаманского. Результаты данной работы свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований цикла серы в подобных экосистемах.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-112.

Литература

1. Li, Jin-tian, et al. «Metagenomic insights into sulfate-reducing bacteria in a revegetated acidic mine wasteland» (2020).
2. Bauer T.V. et al. Ecological–geochemical studies of technogenic soils in the flood plain landscapes of the Seversky Donets, Lower Don Basin // *Geochemistry International*. – 2018. – Т. 56. – № 10. – С. 992–1002.
3. Barton L.L., Fauque G.D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria // *Advances in applied microbiology*. – 2009. – Т. 68. – С. 41–98.

Таксономический состав культивируемых бактерий-антагонистов возбудителя жёлтой болезни гиацинта *Xanthomonas hyacinthi* в микробиоте растений подсемейства *Scilloideae*

Дренова Д.Д.¹, Шабунина Д.В.¹, Дренова Н.В.², Кондратьев М.О.²

¹ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва, da-wuta@mail.ru

² ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Быково, drenova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38265

Xanthomonas hyacinthi (Wakker) Vauterin et al. (*X. campestris* pv. *hyacinthi* (Wakker) Dowson et al.) – карантинный вредный организм, официально отсутствующий на территории РФ и ЕАЭС. Бактерия поражает как луковички, так и надземные части ряда представителей подсем. *Scilloideae* (гиацинт, гиацинтела, мускари, пролеска, хионодокса, эвкомис) [1], вызывая желтую болезнь. В случае проникновения на территорию патоген может нанести вред производству декоративных культур, фондам научных коллекций, а также дикорастущим эфемероидам, в том числе редким и эндемичным видам. В РФ обитают виды родов *Barnardia*, *Bellevalia*, *Hyacinthella*, *Muscari*, *Ornithogalum*, *Pseudomuscari*, *Puschkinia*, *Scilla* – потенциальные растения-хозяева возбудителя [2]. Микробиота местных растений может оказывать влияние на внедрение инвайдера, эффективность диагностики возбудителя, а также быть использована для разработки биологических препаратов [3].

На предыдущем этапе исследования было показано широкое распространение антагонистических микроорганизмов против *X. hyacinthi* в составе микробиоты культурных и дикорастущих эфемероидов подсем. *Scilloideae* – потенциальных растений-хозяев карантинного возбудителя на территории РФ. Антагонистические бактерии были выявлены в 74% образцов различных частей исследованных растений практически из всех исследованных регионов и местообитаний. Культивируемые бактерии, подавляющие рост *X. hyacinthi*, встречались в листьях, цветоносах, цветках, завязях, основании надземной части и луковичках. Встречаемость антагонистов в образцах различных органов луковичных растений составляла от 56 до 100%. Концентрация в тканях варьировала от 1 до 10⁷ КОЕ/г [3].

На данном этапе целью работы была идентификация бактерий-антагонистов *X. hyacinthi*, входящих в состав микробиоты потенциально восприимчивых дикорастущих и культурных растений на территории РФ.

Антагонистические изоляты были выделены из различных органов *Scilla* sp., *S. bifolia*, *S. sibirica*, *S. luciliae*, *Muscari* sp., *M. armeniacum*, *M. latifolium*, *M. neglectum*, *Ornithogallum* sp., *O. umbellatum*, *Puschkinia scilloides*, *Hyacinthus orientalis*, *Hyacinthoides hispanica*, отобранных в коллекции луковичных культур ФГБУН «ФИЦ «Субтропический научный центр РАН» (г. Сочи), на территории г. Сочи, в г. Симферополе, в ГБС РАН (г. Москва) и на дачных участках в Московской области. Изоляты были идентифицированы методом секвенирования частичной последовательности гена субъединицы 16S рРНК с праймерами 8 UA/519 B.

В результате исследования установлено, что 72 изученных изолята культивируемых бактерий, способных подавлять рост *X. hyacinthi*, относились к 10 родам. Среди них преобладали представители р. *Pseudomonas*, относящиеся в основном к группе *fluorescens* (43%). Представители группы были выделены практически из всех органов *H. orientalis*, *S. bifolia*, а также из листьев и лукович других растений (таблица). Кроме того, из листьев *S. bifolia* был выделен изолят фитопатогенной группы *Pseudomonas syringae*.

Наибольшее разнообразие антагонистов отмечено на листьях и других надземных органах, где встречались представители всех родов, за исключением р. *Burkholderia* (*Paraburkholderia*), выделенного только из лукович гиацинта.

Род антагониста	Растение	Орган растения	Кол-во изолятов	Доля, %
<i>Pseudomonas</i>	<i>H. orientalis</i>	листья, цветон., плоды, лук.	32	44
	<i>Muscari</i>	листья		
	<i>O. umbellatum</i>	луковица		
	<i>P. scilloides</i>	листья		
	<i>Scilla sp.</i>	листья, луковицы		
	<i>S. bifolia</i>	лист., завязи, осн. поб., лук.		
	<i>S. siberica</i>	листья		
<i>Bacillus</i>	<i>H. hispanica</i>	листья	12	17
	<i>Muscari</i>	листья		
	<i>Ornithogallum sp.</i>	листья		
	<i>S. siberica</i>	листья, цветки, луковицы		
<i>Rahnella</i>	<i>H. orientalis</i>	листья	8	11
	<i>Muscari</i>	луковицы		
	<i>Scilla sp.</i>	листья		
	<i>S. bifolia</i>	листья		
<i>Staphylococcus</i>	<i>H. orientalis</i>	листья, цветон., луков.	5	7
	<i>Scilla sp.</i>	листья		
	<i>S. bifolia</i>	листья		
<i>Frigoribacterium</i>	<i>S. bifolia</i>	листья	5	7
	<i>H. orientalis</i>	листья, цветоносы, луков.		
Curtobacterium, Flavobacterium	<i>H. orientalis</i>	листья	4	6
	<i>Scilla sp.</i>	листья, осн. побега		
<i>Erwinia</i>	<i>Muscari sp.</i>	листья	3	4
	<i>S. bifolia</i>	листья		
<i>Burkholderia</i>	<i>H. orientalis</i>	луковицы	1	1
<i>Janthinobacterium</i>	<i>H. orientalis</i>	листья	1	1
<i>Kocuria</i>	<i>Muscari sp.</i>	листья	1	1

Литература

- [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.eppo.int> (дата обращения 10.10.2022).
- Дренова Н.В., Яремко А.Б., Шнейдер Е.Ю., Ванькова А.А., Свиридова Л.А., Меньшова С.С., Кондратьев М.О. Характеристика микробиоты луковичных декоративных культур в приложении к разработке диагностики возбудителя желтой болезни гиацинта *Xanthomonas hyacinthi* (Wakker) Vauterin et al. // Сборник статей Международной научной конференции «АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ-2021» (Москва, 24–25 ноября 2021 г.) Москва: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2021. Т. 1. 925–931. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.26897/978-5-9675-1855-3-2021-194.
- Дренова Н.В., Каримова Е.В., Шнейдер Е.Ю., Слепченко Н.А., Дренова Д.Д. Оценка встречаемости антагонистов возбудителя желтой болезни гиацинта *Xanthomonas hyacinthi* в составе микробиоты потенциальных растений-хозяев // Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» – Москва: Издательство Перо, 2022 – Мб. [Электронное издание] – С. 59 ISBN 978-5-00204-342-2.

Влияние факторов культивирования на фосфат мобилизующую способность почвенных бактерий *Pantoea brenneri*

Егорова Е.А., Сулейманова А.Д.

Казанский (Приволжский) Федеральный университет,
egorova.evgenia@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38266

Важной проблемой для сельского хозяйства становится снижение запасов фосфора в почве. Фосфатные минералы являются основными источниками фосфора в природе. Однако большинство фосфатных минералов плохо растворимы и медленно усваиваются. В почве большая часть фосфора представлена первичными труднорастворимыми минералами в виде апатитов, фосфоритов, фторапатитов, ортофосфатов. Такие формы фосфора не доступны для растений. Применение в сельском хозяйстве бактериальных удобрений, на основе фосфатсольюбилизирующих бактерий (PSB), увеличит доступность фосфора в почве и улучшит рост сельскохозяйственной продукции. Внесение PSB в почву снижает pH почвы и формирует вокруг ризосферы область, содержащую в себе свободные фосфаты, тем самым благоприятно воздействуя на рост и развитие растений.

Представляло интерес изучить влияние факторов культивирования на фосфат мобилизующую способность почвенных бактерий *Pantoea brenneri*. Для изучения мобилизации фосфатов были выбраны штаммы: *P. brenneri* 3.1, *P. brenneri* 3.2, *P. brenneri* 3.5.2, *P. brenneri* 3.6.1.

Исследование проводили на твердой питательной среде NBRIP, содержащей в качестве единственного источника фосфора труднорастворимый фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. При количественном исследовании мобилизации фосфатов штаммами *P. brenneri* показали, что максимальной эффективностью P-сольюбилизации обладал штамм *P. brenneri* 3.5.2 – 68.74%, количество выделенных фосфатов – 1341.66 мг/л.

Для изучения влияния факторов культивирования, на способность штамма *P. brenneri* 3.5.2 к мобилизации фосфатов, изменяли pH среды, температуру культивирования и аэрацию (скорость качания).

Влияние исходного pH среды изучали в диапазоне 2–9. Установили, что исходный pH среды равный 7.0 оказывал стимулирующее действие на мобилизацию фосфатов из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – эффективность сольюбилизации составила 44%.

Влияние температуры культивирования на способность штамма к мобилизации фосфатов изучали в диапазоне 25–42 °С. Эффективность сольюбилизации при изучаемых температурах выше 30 °С была в пределах 42–46%. Таким образом, в диапазоне от 30 до 42 °С не выявлено зависимости мобилизации фосфатов из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ штаммом *P. brenneri* 3.5.2 от температуры культивирования.

Изучение влияния скорости качания проводили в диапазоне от 100 до 230 об/мин. Скорость качания, равная 200 об/мин оказывала стимулирующее действие на мобилизацию фосфатов из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ штаммом *P. brenneri* 3.5.2 – эффективность сольюбилизации составила 42.23%.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантом РНФ 21-76-00017.

Новая анаэробная спорообразующая бактерия из арктической прибрежной почвы

Захарюк А.Г., Зиновьева О.В., Щербакова В.А.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
kuran82@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38267

Температура является одним из важнейших экологических факторов, влияющих на микроорганизмы. Постоянно холодные экосистемы достаточно широко распространены на Земле.

В дополнение к холоду, многие из этих экосистем характеризуются малым содержанием кислорода или полным его отсутствием. Низкотемпературные бескислородные природные экосистемы очень разнообразны и включают в себя морские донные осадки [1], микробные маты [2], многолетнемерзлые отложения Арктики и Антарктики. В подобных экосистемах бактерии вынуждены выживать при температурах ниже нуля, низком содержании питательных веществ и свободной воды в течение тысяч лет. Несмотря на это, прокариотные клетки не только выживают в таких экстремальных условиях, но растут и размножаются.

Целью данной работы было выделение и описание новой анаэробной бактерии рода *Clostridium* из проб почвы, отобранной в районе Ивашкиной лагуны (полуостров Быковский, Российская Арктика).

Из пробы верхнего горизонта почвенного разреза Ивашкиной лагуны методом предельных разведений в жидкой среде с лактатом в качестве источника углерода была получена чистая культура – штамм TG1. Клетки штамма TG1 представлены подвижными палочками размером 1,0–1,2×2,0–5,0 мкм. Клетки располагались одиночно, реже встречались сцепленные по две – четыре. Окраска по Граму – положительная. Новый изолят – строгий анаэроб. Спорообразование наблюдали только в случаях создания крайне неблагоприятных условий для выделенного штамма, таких как выдерживание в аэробных условиях в течение суток. В этих условиях клетки образовывали терминально расположенную спору. Тест на каталазу и оксидазу – отрицательный.

Была определена частичная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма TG1 размером 619 пар нуклеотидов. Филогенетический анализ показал, что выделенный штамм кластеризуется с психрофильными представителями рода *Clostridium* семейства *Clostridiaceae* филума *Firmicutes*. Ближайшими родственными видами оказались *Clostridium bowmanii* (99,6% сходства), выделенный из микробного мата пресноводного озера Фрикселл, Антарктика и *C. algoriphilum* (98,5% сходства), выделенный из криопэга Колымской низменности, Российская Арктика, с оптимумом роста при 5–6 °С.

Штамм TG1 при температуре культивирования 6 °С использовал для роста широкий спектр органических соединений: ксилозу, галактозу, сахарозу, рибозу, мальтозу, целлобиозу, лактозу, пептон. На рамнозе рост не наблюдался.

Выделенный изолят характеризовался высокой ферментативной активностью лейцин-ариламидазы; кислой фосфотазы; нафтол-AS-BI-фосфогидролазы; α-галактозидазы; β-галактозидазы; α-глюкозидазы; β-глюкозидазы; N-ацетил-β-глюкозаминидазы. Так же положительная реакция наблюдалась в следующих ферментативных тестах: щелочной фосфотазы; эстеразы (C4); эстеразы липазы (C8); α-фукозидазы. Штамм TG1 был отрицательным по липазе (C14); валин-ариламидазе; цистин-ариламидазе; трипсину; α-химотрипсину; β-глюкуронидазе; α-маннозидазе.

Нами была проверена способность штамма TG1 к микробной железоредукции при температуре 6 °С. Ранее показано, что преобладание двухвалентной формы железа над трехвалентной в большинстве изученных образцов многолетнемерзлых отложений и современной минеральной почвы Арктики указывает на превалирование процесса железоредукции, что позволяет предположить наличие бактерий, спо-

способных осуществлять этот процесс, в составе микробных сообществ описанных низкотемпературных экосистем [3]. Выделенная нами бактерия была способна восстанавливать железо: на 30 сутки культивирования образовывалось до 5,7 мМ Fe(II), что составляло более 50% от исходного количества трехвалентного железа в среде. Следует отметить, что штамм TG1 использовал железо только в растворимой форме в виде цитрата Fe(III) с ацетатом в качестве источника углерода и энергии. При замене цитрата Fe(III) на слабокристаллический оксид железа, аналог природного минерала ферригидрита, образование и накопление ионов Fe(II) зафиксировано не было. Можно предположить, что в микробном сообществе выделенный организм использует трехвалентное железо для стока электронов, играя тем самым важную роль в процессах биоминералообразования и формирования почв и осадочных отложений в холодных экосистемах. Способность к восстановлению железа у представителей психрофильных *Clostridium* spp. ранее не изучалась.

В результате работы, из проб современной тундровой почвы была выделена и частично охарактеризована чистая культура анаэробных сахаролитических бактерий – штамм TG1. Новый изолят является первым психрофильным представителем рода *Clostridium*, для которого показана способность восстанавливать соединения трехвалентного железа.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-24-00518.

Литература

1. Vandieken V., Mußmann M., Niemann H., Jørgensen Bo B. *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1133–1139.
2. Fernández-Valiente E., Camacho A., Rochera C., et al. Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Island, Antarctica) // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. P. 377–385.
3. Ривкина Е.М., Федоров-Давыдов Д.Г., Захарюк А.Г., Щербакова В.А., Вишневская Т.А. Свободное железо и железовосстанавливающие микроорганизмы в почвах и многолетнемерзлых отложениях северо-востока Сибири // Почвоведение. 2020. №10. С. 1247–1261.

Скрининг микроводорослей *Chlorophyta*, способных к росту на жидких отходах производства

Зиганшина Э.Э., Булынина С.С., Юрьева К.А., Зиганшин А.М.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
elvira.ziganshina@kpfu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38268

Микроводоросли – это фототрофные микроорганизмы, которые имеют важное экологическое значение в природе и являются объектами многих биотехнологий. Биотехнологии производства биомассы микроводорослей основываются на фотосинтетических возможностях данных микроорганизмов и их экологических особенностях. Сегодня из биомассы микроводорослей получают различные ценные продукты, начиная от компонентов корма сельскохозяйственных животных и аквакультуры, фармацевтических препаратов и заканчивая биотопливом [1, 2]. В настоящее время данные микроорганизмы активно внедряются в биотехнологии очистки отходов и сточных вод с одновременным производством ценной биомассы [3, 4].

Многие представители микроводорослей обладают способностью эффективно использовать питательные вещества разнообразных стоков, сточных вод, жидких отходов производства, однако существует необходимость преодоления ограничений для разработок промышленного уровня. Высокие

или несбалансированные концентрации питательных веществ, наличие конкурирующих микроорганизмов, токсичных соединений в стоках и отходах диктуют исследователям необходимость поиска и подбора активных и устойчивых к загрязнениям микроводорослей для целей биотехнологий [4].

В настоящей работе оценен потенциал отдельных штаммов зеленых водорослей *Chlorophyta* к росту и накоплению биомассы на питательной среде на основе анаэробного дигестата.

В настоящей работе разбавленный дигестат, полученный в результате совместной обработки отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства в анаэробных системах (с дополнительным внесением фосфатов и сульфатов), был использован в качестве среды роста для штаммов микроводорослей семейств *Chlorellaceae*, *Scenedesmaceae* и *Neochloridaceae*, выделенных из водоёмов Казани (Республика Татарстан, Россия). Идентификацию чистых культур водорослей *Chlorophyta* проводили на основе анализа последовательностей нуклеотидов гена рибулозобифосфаткарбоксилазы. Культивирование культур микроводорослей осуществляли в фотобиореакторе с рабочим объёмом 2.6 л с лампами Gro-Lux с синим и красным излучением (Labfors 4, Infors HT) с постоянным перемешиванием среды роста, при температуре 28 °С, освещении 1000 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ с фотопериодом свет/темнота – 16:8, в условиях аэрирования и подачи 2.0% углекислого газа.

Анализ показателей роста и продуктивности тестируемых штаммов позволил отметить, что среда роста на основе анаэробного дигестата с ионами аммония в качестве основного источника азота удовлетворяла питательным потребностям большинства микроводорослей. Предобработка дигестата центрифугированием и разбавлением стерильной водой позволила снизить ограничение света на рост микроводорослей и удалить твердые частицы, а также осадить большинство микроорганизмов дигестата. Наибольшие показатели роста и продуктивности были отмечены у представителей семейства *Chlorellaceae*. Дополнительно отмечено, что отдельные штаммы зеленых водорослей были способны быстро акклиматизироваться к повышению концентрации анаэробного дигестата в среде роста и производить водорослевую биомассу с высоким содержанием белков.

Полученные результаты открыли возможность накопления водорослевой биомассы с использованием дигестата анаэробных реакторов как основы среды роста с целью снижению затрат на культивирование и решения вопроса утилизации побочных продуктов анаэробной конверсии отходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 22-24-20044.

Литература

1. Fabris M., Abbriano R.M., Pernice M., Sutherland D.L., Commault A.S., Hall C.C., Labeeuw L., McCauley J.I., Kuzhiuparambil U., Ray P., Kahlke T., Ralph P.J. Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front Plant Sci* 2020, 11: 279.
2. Gangl D., Zedler J.A.Z., Rajakumar P.D., Martinez E.M.R., Riseley A., Wlodarczyk A., Purton S., Sakuragi Y., Howe C.J., Jensen P.E., et al. Biotechnological exploitation of microalgae. *J Exp Bot* 2015, 66, 6975–6990.
3. Plohn M., Spain O., Sirin S., Silva M., Escudero-Oñate C., Ferrando-Climent L., Allahverdiyeva Y., Funk C. Wastewater treatment by microalgae. *Physiol Plant* 2021, 173, 568–578.
4. Bauer L., Ranglova K., Masojidek J., Drosig B., Meixner, K. Digestate as sustainable nutrient source for microalgae—challenges and prospects. *Appl Sci* 2021, 11, 1056.

Океанические планктонические гомологи декорирующего капсид белка Нос бактериофага RB30

Зимин А.А.¹, Никулина А.Н.¹, Никулин Н.А.¹, Кощаев А.Г.²,
Хя Н.³, Lu Y.⁴, Дроздов А.Л.⁵

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

² ФГБОУ ВО Кубанский Государственный Аграрный Университет, г. Краснодар

³ School of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou, China

⁴ School of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

⁵ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток,
dr.zimin8@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38269

Декорирующий белок капсида бактериофага Т4 (*Caudoviricetes*; *Straboviridae*; *Tevenvirinae*; *Tequatrovirus*) белок Нос (от английского: **H**ighly antigenic **O**uter **C**apsid protein) состоит из трех Ig-подобных доменов и С-концевого домена, имеющего слабое сходство с Ig-доменами и ответственного за прикрепление к поверхности шестичленного капсомера на поверхности капсида. Гомолог этого белка у фага RB30, содержит дополнительный PKD-домен. То есть, у Нос-RB30 на в N-концевой части белка не три Ig-домена, а четыре. Это вызвано появлением тандемного, почти идентичного повтора второго Ig-домен (PKD-домена) белка Нос бактериофага Т4 [1–3]. При исследовании последовательности ДНК гена *нос* фага RB30 обнаруживается слабовырожденный тандемный повтор, который мог возникнуть только за счет внутригенной дупликации. Подобное явление обнаружено нами ранее не только для RB30, но и для ряда других Т4-родственных фагов, представителей подсемейства *Tevenvirinae* [1], например, бактериофагов RB69 и AehI. Анализ аминокислотных замен в таких белках и их тандемных повторах показал их независимое эволюционное происхождение [1, 2]. Следовательно, можно предположить наличие положительного отбора на закрепление в потомстве бактериофагов данной дупликации при её возникновении при «миграции ветви» во время репликации фаговой ДНК. Этот, положительный отбор может быть связан с потенциальной способностью фагового PKD-домена к Ca₂₊-опосредованному связыванию олигосахаридов слизи кишечника животных или других функциональных олигосахаридов. Анализ GenBank показал, что дупликация PKD-домена в декорирующих капсид Т4-фагов белках является достаточно частым явлением. Возможно, положительный отбор, действующий на данную структуру, может быть связан с повышением аффинности связывания бактериофагов Т4-типа полигликозидами слизи разных животных и тем самым с более эффективной аккумуляцией бактериофагов в том или ином биотопе. Поиск гомологов белка Нос-RB30 с помощью PSI-BLAST в метагеноме Global Ocean Sampling (GOS) из проб планктонической микробиоты Атлантического и Тихого позволил найти 34 гомолога со статистическим порогом E-value ниже или равно 0.004. Эволюционное сходство найденных последовательностей и Нос-белков длиной около 472 было изучено методом минимальной эволюции (рис. 1) [4]. Таксоны были сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода поправки Пуассона и выражены в единицах числа аминокислотных замен на сайт. Эволюционные анализы проводились в MEGA X [5]. На дереве видно, что океанические планктонические гомологи Нос RB30 проявляют большее сходство с дальнеродственными декорирующими капсид белками Т4-фагов. Найдены океанические белковые последовательности, которые могут взаимодействовать со специфическими гликозидами океанического планктона за счет дублированного домена адгезии. Это позволяет надеется на получение методами белковой инженерии на основе найденных последовательностей фагов, высокоактивных в связывании с лигандами из морских биотопов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669>.

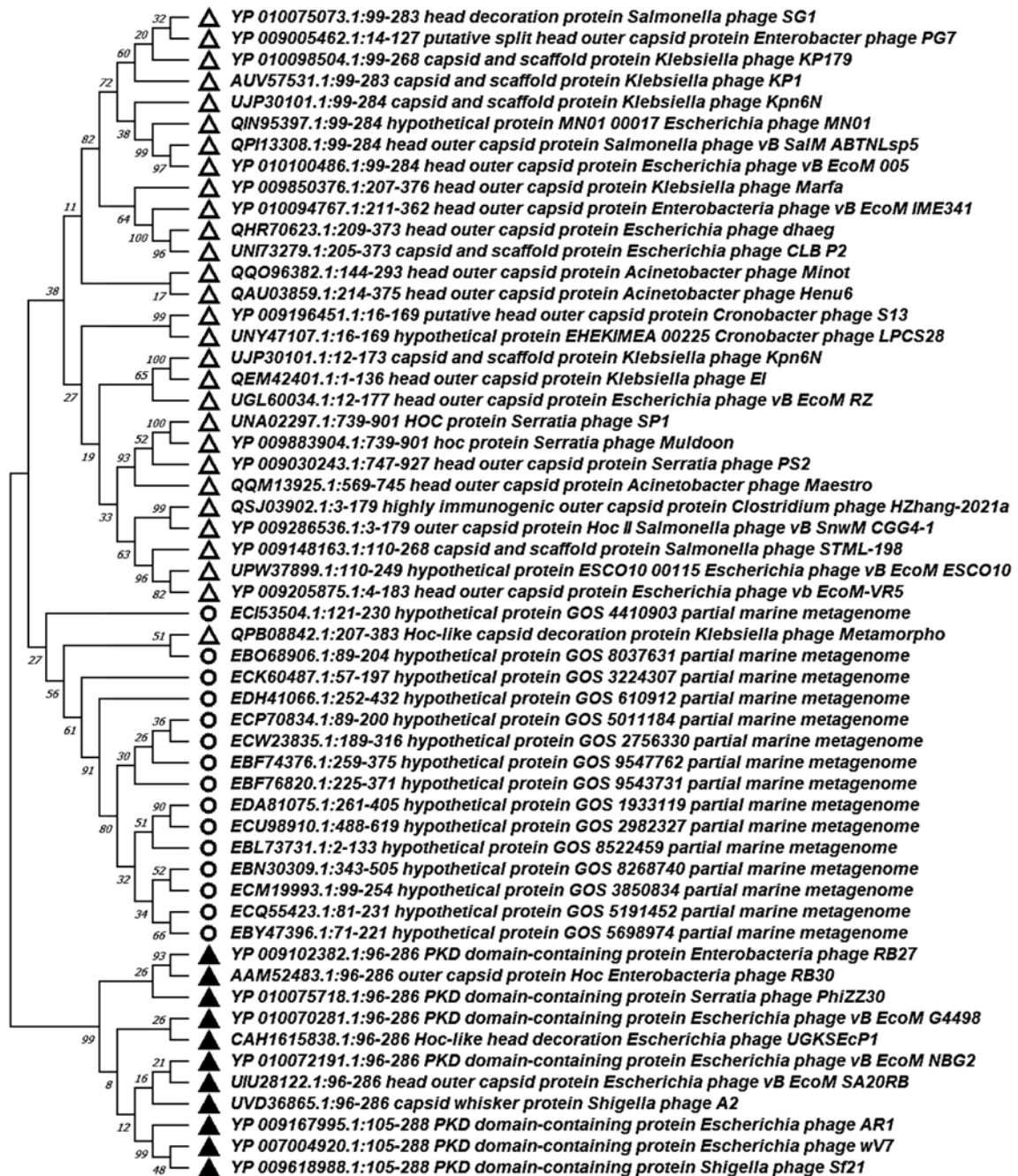


Рис. 1. Эволюционные взаимоотношения океанических гомологов Нос RB30 (отмечены кружками), близкородственных гомологов (черные треугольники) и дальнеродственных (белые треугольники)

Литература

1. Mathematical Biology and Bioinformatics 2018. V. 13. № S. P. s1. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.17537/2018.13.s1 Additional materials to the article: Zimin A.A., Mikoulinskaia G.V., Nigmatullina L.F., Nazipova N.N. Mathematical Biology and Bioinformatics. 2018. V. 13. № 1. P. t39-t58. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.17537/2018.13.t39.
2. Zimin A.A., Mikoulinskaia G.V., Nigmatullina L.F., Nazipova N.N. Comparative Analysis of Amino Acid Sequences in Particular Domains of Hoc Proteins in Teequatrovirinae Subfamily Bacteriophages. Mathematical Biology and Bioinformatics 2018. V. 13. No S. P. t39-t58. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.17537/2018.13.t39.

3. Зимин А.А., Микулинская Г.В., Нигматуллина Л.Ф., Назипова Н.Н. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей отдельных доменов белков Нос бактериофагов подсемейства Teequatrovirinae. Математическая биология и биоинформатика. Т. 7, № 2, 2012 г. С. 611–631.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Кандидат-основатель нового семейства *Bunquisepoviridae* и рода *Bunquisepovirus* умеренный бактериофаг *Enterococcus B1578*

Казанцева О.А.¹, Семкин Д.А.², Шадрин А.М.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
olesyakazantseva@bk.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38270

Рост массива данных секвенирования нового поколения позволяет пролить свет на скрытое разнообразие умеренных бактериофагов в микробном сообществе. На сегодняшний день лишь небольшая часть умеренных бактериофагов была хорошо охарактеризована. Для подавляющего большинства бактериальных штаммов роль профагового носительства, особенно множественного профагового носительства, плохо изучена. Полилизогению часто считают результатом адаптивного эволюционного процесса, в котором профаги могут передавать бактерии-хозяину факторы приспособленности и/или вирулентности, что делает их важными векторами для эволюции как бактериальных популяций, так и инфекционных заболеваний.

Род бактерий *Enterococcus*, включающий как патогенные, так и комменсальные микроорганизмы, повсеместно распространен в окружающей среде. Особую опасность представляет распространение антибиотикорезистентных видов *E. faecium* и *E. faecalis*. Так, например, *E. faecalis* входит в состав основного микробиома желудочно-кишечного тракта человека. Однако в последние десятилетия этот вид бактерий стал основной причиной внутрибольничных инфекций во всем мире. Некоторые изоляты особенно адаптированы к больничной среде, и недавно была открыта связь этой адаптации с обогащением геномов мобильными генетическими элементами, в том числе профагами, интегрированными в хромосомы бактерий.

В данной работе мы описываем нового умеренного бактериофага B1578, инфицирующего бактерии рода *Enterococcus*. Бактериофаг B1578 был выделен из штамма *Enterococcus* sp. VKM B-1578 с помощью индукции митомицином С. Для определения спектра хозяев бактериофага B1578 очищенный фаговый препарат с титром 10^{10} БОЕ/мл был испытан на 24 штаммах рода *Enterococcus*. Анализ результатов показал, что B1578 способен заражать только один штамм *E. faecium* VKPM B-5000 из всей протестированной коллекции. На газоне чувствительного штамма *E. faecium* VKPM B-5000 бактериофаг B1578 формирует мутные бляшки диаметром 0,3–2 мм.

Морфологический анализ с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показал, что фаг B1578 имел икосаэдрический капсид с и длинным несокращающимся хвостом. Бактериофаг B1578 имеет типичные морфологические признаки морфотипа siphovirus.

Анализ рН- и термо- стабильности данного фага показал, что B1578 является стабильным бактериофагом, который выживает в диапазоне рН от 5 до 11 и в диапазоне температур от 4 до 70 °С в течение 1 часа с сохранением своей литической активности.

Секвенирование ДНК бактериофага B1578 было произведено на платформе Illumina, с последующей сборкой генома с помощью SPAdes 3.15.0 и структурной аннотацией с помощью RASTtk. Секвенирование и аннотация генома показали, что геном бактериофага B1578 представляет собой линейную

дцДНК длиной 40 049 п.н. и GC-составом 36,0%. Геном B1578 содержит 59 открытых рамок считывания, 40 (67,8%) из которых были функционально аннотированы с использованием BLASTp (NCBI) и HHpred. Кодированные белки бактериофага B1578 были разделены на пять функциональных модулей: модуль упаковки и структуры / морфогенеза ДНК, литический модуль, модуль репликации, репарации и рекомбинации ДНК, модуль поддержания профага.

Дополнительно была секвенирована полногеномная последовательность штамма-хозяина *Enterococcus* sp. VKM B-1578. Выявлено, что полный геном бактериофага B1578 локализован в одном из секвенируемых контигов, окруженных последовательностями ДНК хозяина, что свидетельствует об интегрированном состоянии профага B1578. Был идентифицирован сайт интеграции фага: он расположен на 91 п.н. ниже гена сайт-специфичной интегразы в геноме B1578 и имеет следующую последовательность: 5' – AAGTGTCTGTTTATCCAGTAGCTCAAGAAGCTTAAT – 3'.

Филогенетический анализ больших субъединиц терминазы используется в таксономической классификации бактериофагов, а также может применяться для прогнозирования стратегий упаковки фаговой ДНК и типов концов генома. Чтобы предсказать механизм упаковки бактериофага B1578, белок большую терминазу B1578 сравнивали с терминазами фагов с хорошо изученными механизмами упаковки ДНК. Филогенетический анализ показал, что аминокислотная последовательность большой субъединицы терминазы B1578 попадает в одну общую кладу с белками бактериофагов *Salmonella* virus P22, *Salmonella* phage ST64T и *Enterobacteria* phage LP7, которые, как известно, используют headful-механизм упаковки. Биоинформатическое предсказание было подтверждено экспериментально с помощью рестрикционного анализа ДНК: ДНК фага B1578 расщепляли BglIII, BamHI, PstI, XbaI, HindIII, KpnI и EcoRV *in silico* и *in vitro* с последующим сравнением полученных рестрикционных картин. Оба паттерна рестрикции были идентичны, за исключением субмолярных полос, которые появились при *in vitro* анализе. Дополнительные субмолярные полосы содержат *pac*-фрагменты и их появление характерно для фагов с «headful» механизмом упаковки. Так, рестрикционный анализ ДНК B1578 подтвердил, что бактериофаг B1578 использует «headful» стратегию упаковки ДНК.

Для выявления филогенетической связи бактериофага B1578 с известными вирусами было построено вирусное протеомное дерево с использованием сервера ViPTree версии 3.1. Ближайшим родственным бактериофагом для B1578 является бактериофаг *Enterococcus* phage vB_EfaS_IME197, с которым B1578 имеет 11.91% нуклеотидной идентичности и 10% общих белков, что дает основания для выделения новой таксономической единицы с представителем B1578 (установленный критерий ICTV для создания рода составляет 70% общей нуклеотидной идентичности и для создания семейства – 10% общих белков). Таким образом, анализ показал, что бактериофаг B1578 филогенетически удален от ближайших родственных вирусов настолько, что может являться кандидатом-основателем не только нового рода *Bunquisepocavirus*, но и нового семейства *Bunquisepocaviridae*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Применение нового вычислительного метода TemPhD для обнаружения умеренных бактериофагов из необработанных данных NGS

Казанцева О.А., Шадрин А.М.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
olesyakazantseva@bk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38271

Умеренные бактериофаги (активные профаги, индуцированные бактериями) – важные «компоненты» для жизни и эволюции бактерий, поскольку способны модулировать структуру и гомеостаз микро-

бного сообщества, а также за счет своей способности опосредовать перенос генов между бактериями, они могут контролировать патогенность, вирулентность бактерий и способствовать их устойчивости к антибиотикам.

Умеренные бактериофаги могут проходить как лизогенный цикл развития, так и литический. В литическом цикле умеренные бактериофаги после этапа сборки вирусных частиц лизируют инфицированных бактерий-хозяев, чтобы высвободить свое потомство. Однако, характерной чертой умеренных бактериофагов является длительное пребывание в состоянии профага в хозяйской бактериальной клетке, т.е. реализация лизогенного пути развития. Выделяют две основные формы состояния профага: 1) интегрированные профаги – форма профага, в которой фаговая ДНК либо интегрирована в хромосомную ДНК, либо в плазмидную ДНК клетки-хозяина; 2) плазмидные профаги – форма, в которой фаговая ДНК находится в виде автономно-реплицирующийся плазмиде в цитоплазме хозяина. Таким образом, умеренные бактериофаги, находящиеся в состоянии профага, способны участвовать в основных бактериальных клеточных процессах, а также действовать как оружие бактериальной конкуренции, кодируя защитные механизмы, такие как системы рестрикции-модификации (RM), CRISPR/анти-CRISPR и возможно, обеспечивают множество дополнительных систем защиты от вирусов, которые еще предстоит полностью идентифицировать.

На данный момент в мире было секвенировано более 14 000 полных фаговых геномов. Стоит отметить ряд значительных проблем связанных с существующим набором генетических данных бактериофагов, а именно: 1) в исследованиях преобладают фаги, которые инфицируют небольшое количество родов бактерий, при этом 75% фагов изолированы только от 30 родов бактерий; 2) в базе данных значительно больше геномов литических фагов (~70%), чем умеренных (~30%). В совокупности это приводит к тому, что около 54% геномов умеренных фагов происходят всего лишь от трех бактериальных родов. Причем, было обнаружено, что частота носительства генов устойчивости к антибиотикам выше у умеренных фагов, чем у литических фагов, и снова варьирует в зависимости от хозяина.

Таким образом, учитывая предвзятость секвенируемых в настоящее время фаговых геномов, в мировом научном сообществе предлагают для полного понимания фагового разнообразия и биологии бактериофагов предпринять усилия для выделения и секвенирования большего количества бактериофагов, в частности умеренных бактериофагов, из большего разнообразия хозяев.

Традиционные методы, применяемые для выделения, изучения и характеристики бактериофагов зачастую неприменимы к умеренным бактериофагам из-за их склонности к формированию профагов, затрудняющей их идентификацию, выделение и характеристику. Кроме того, для выявления умеренных бактериофагов необходимо иметь колоссальную коллекцию бактерий, поскольку даже при успешной индукции активного бактериофага из состояния профага далеко не всегда можно наблюдать литическую активность вирусных частиц на газоне штаммов из имеющейся бактериальной коллекции, так как зачастую спектр чувствительных штаммов у умеренных бактериофагов достаточно узкий. Стоит также отметить, что умеренные бактериофаги часто являются представителями новых высокоранговых вирусных таксонов, таких как род или семейства.

На данный момент однозначно понятно, что полные последовательности геномов бактериофагов, особенно находящихся в форме профага, необходимы для таксономии и биологии бактериофагов.

Для облегчения поиска и изучения умеренных бактериофагов требуется применение биоинформатических методов анализа. Существует несколько инструментов биоинформатики для прогнозирования профагов в собранных бактериальных геномах, например, такие как Phage_Finder, Prophage finder, Prophinder, PHAST, PHASTER, PhiSpy, VirSorter, Prophage Hunter и VIBRANT. Однако перечисленные выше программы обычно не в состоянии обнаружить точные и полные геномы умеренных фагов.

В августе 2022 года была опубликована статья «Mining bacterial NGS data vastly expands the complete genomes of temperate phages» в журнале «NAR Genomics and Bioinformatics», которая описывается новый компьютерный метод TemPhD для поиска новых полных последовательностей геномов умеренных бактериофагов. По заверению авторов статьи данный метод превосходит другие современные методы прогнозирования профагов.

Метод TemPhD включает три этапа: 1) Обработка данных секвенирования следующего поколения (NGS); 2) Обнаружение области профага, которое основано на биологии умеренных бактериофагов, а именно следующих: (i) в процессе репликации при литическом цикле развития фаговый геном обычно циркулирует; (ii) во время цикла лизогенизации умеренный бактериофаг интегрирует-

ся в хромосому хозяина по сайтам интерзации (*attP/attB*); (iii) активные профаги обычно подвергаются спонтанной индукции с относительно низкой частотой, что приводит к небольшому количеству умеренных фагов в бактериальной культуре; 3) обнаружение умеренных бактериофагов (в методе *TemPhD* профаг рассматривается как умеренный бактериофаг, если профаг может циркулировать сам по себе).

В нашем исследовании мы применили новый вычислительный метод *TemPhD* для обнаружения умеренных бактериофагов в нескольких отсеквенированных бактериальных штаммах рода *Bacillus* и рода *Enterococcus*. Мы использовали штаммы, из которых нами были выделены, секвенированы и охарактеризованы бактериофаги, находящиеся в состоянии профага, а также штаммы, в которых мы лишь предполагаем наличие профага. Также мы протестировали программу *TemPhD* на обнаружение двух форм профага: как интегрированных профагов, так и плазмидных профагов. В результате чего нами было обнаружено некоторое ограничение применения данного вычислительного метода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Эндофитные дрожжи в плодах сельскохозяйственных культур

Качалкин А.В.^{1,2}, Глушакова А.М.^{1,2,3}, Стрелецкий Р.А.¹, Томашевская М.А.²,
Савченко В.Е.¹, Венжик А.С.¹, Лепешко А.А.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
kachalkin_a@mail.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

³ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38272

Исследование эндофитных дрожжей – актуальное междисциплинарное направление на стыке фундаментальной и прикладной науки. Для характеристики эндофитного сообщества были изучены около 80 наименования плодов (фрукты, овощи и орехи) из 38 стран, включая выращенные в России. Закупки сельскохозяйственной продукции российского и зарубежного происхождения осуществлялись в розничных магазинах г. Москвы и Московской области. Исследование проводили по следующей схеме: стерилизация поверхности плодов – отбор внутренних тканей – приготовление суспензии – посев – создание коллекции эндофитных дрожжей – видовая идентификация – анализ физиологических свойств.

Результаты исследования показали, что эндофитное развитие микроорганизмов во внутренних тканях сочных и высокосахаристых плодов – распространенное явление, причем это не что-то редкое, а скорее норма. Были изучены около 2000 образцов плодово-ягодных и овощных культур из торговых сетей. Дрожжевые грибы численностью более 500 КОЕ/г были обнаружены почти в 90% исследованных образцов тканей. Всего было обнаружено более 100 видов дрожжей, в то числе и новые виды. Собранные нами данные демонстрируют присутствие самых разных экологических группировок дрожжей в качестве эндофитов – среди них эвритопы, эпифиты, фитопатогены и оппортунисты.

Дрожжи-аскомицеты преобладали почти во всех исследованных группах сельскохозяйственной продукции, их средняя доля была около 75%. Обнаружены с высокой частотой встречаемости как в отечественной, так и в импортной продукции виды: *Candida zeylanoides*, *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces fabryi*, *D. hansenii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *C. parapsilosis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Meyerozyma guilliermondii* и *Rh. babjevae*. Статистический анализ полученных результатов показал заметные отличия сообществ эндофитных дрожжей в плодах разных исследованных групп сельскохозяйственных растений отечественного производства от импортного, а также, за небольшим исключением, фруктово-ягодных группировок от овощной продукции.

Выявлена высокая встречаемость клинически значимого вида *C. parapsilosis* в ряде плодов. Обнаружено, что почти все исследованные культуры этого вида проявляют ту или иную степень устойчивости к разным концентрациям 2–5 наименований антибиотиков (Амфотерицин В, Нистатин, Миконазол, Кетоконазол, Флюконазол и Клотримазол). Также 22% тестируемых культур обладали активной фосфолипазой А2.

Созданная в ходе проведенного исследования коллекция эндофитных дрожжей позволила оценить стимулирующие рост растения свойства культур и отобрать штаммы, которые можно использовать в качестве биоконтроля развития фитопатогенов. Были исследованы 103 штамма дрожжей (17 видов) на антагонизм по отношению к 8 видам фитопатогенов из родов *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* и *Ustilago*. Обнаружено, что около 20% штаммов дрожжей проявляют антагонизм. Наиболее широкий спектр антагонизма по отношению к фитопатогенам обнаружен у дрожжей *A. pullulans*, *H. uvarum*, *Met. pulcherrima*, а также у *Yarrowia lipolytica*. Исследование синтеза фитогормона гетероауксина (ИУК) было выполнено для 97 штаммов дрожжей, относящихся к частым видам в эндофитном сообществе. Все исследованные виды дрожжей были способны к синтезу ИУК, однако уровень продукции носил штаммовый характер. Наиболее активными продуцентами ИУК были виды *A. pullulans*, *C. zeylanoides*, *H. uvarum*, *Met. pulcherrima*, *Meu. caribbica*, *Rh. mucilaginoso* и *Y. galli*. Для 9 видов дрожжей, часто встречающихся в яблоках, был оценен синтез фитогормона зеатина, и у 70.6% исследованных штаммов его продукция была обнаружена. Расширенный анализ фитогормональной активности для штаммов одного из перспективных видов для биоконтроля развития фитопатогенов – *Met. pulcherrima* – показал, что продукция ИУК встречается у 100% штаммов, зеатина – у 85.7% и гибберелина (ГКЗ) – у 28.6% исследованных культур.

В собранной коллекции дрожжей-эндофитов были обнаружены и писаны новые виды: *Candida pellucidi*, *Cyberlindnera dauci*, *Leucosporidium egoroviorum*, *Metschnikowia taurica*, *Papiliotrema horticola* и *Vishniacozyma phoenicis*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-74-10002.

Обилие и разнообразие прокариотных сообществ зональных ферралитных почв и сопряженных субстратов (опад и «подвешенная почва») заповедников Вьетнама

Князева А.В.^{1,2}, Лысак Л.В.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
aknyazeva1999@gmail.com

² ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38273

Почвоведение охватывает широкий спектр вопросов, связанных с генезисом, распространением и использованием почв – корнеобитаемого слоя земной поверхности, также представляющего собой место обитания, питания, развития и размножения многих микроорганизмов. Наиболее высокое разнообразие почвенных прокариот приурочено к субтропической и тропической зоне Азиатско-Тихоокеанского региона. Изучение микробных сообществ целинных почв представляется важным ввиду усиливающейся антропогенной нагрузки на природные биогеоценозы. Одним из лидеров по темпам развития экономики на территории Юго-Восточной Азии является Вьетнам – аграрное государство с развивающимся промышленным сектором. Значительные площади земельного фонда страны в XX веке подвергались сильнейшему антропогенному воздействию, поэтому изучение разнообразия почвенных организмов с целью сохранения сообществ в ненарушенных почвах заповедников и национальных парков представляется весьма актуальным. Практически не проводилось микробиологического исследования почв

и сопряженных субстратов, включающего как классические (посев на питательные среды, учет численности и биомассы отдельных групп микроорганизмов прямым микроскопическим методом), так и современные молекулярные методы (анализ таксономического разнообразия на основании баркодинга гена 16S рНК, RT-ПЦР, FISH) микробиологии в большинстве ООПТ Вьетнама.

Ферраллитные почвы (Ferralsols (WRB)) развиваются под лесной растительностью условиях влажного субтропического климата на продуктах выветривания основных изверженных пород. Общая площадь ферраллитных почв в мире оценивается около 750 млн га, они приурочены, в основном, к влажным тропическим лесам Америки, Африки и Юго-Восточной Азии. При общих благоприятных физических свойствах данные почвы обладают низкими показателями кислотности (рН 3,8–5,6) и, в целом, достаточно низким уровнем плодородия (1,5–5,7% гумуса). Большая часть почв данного типа используется в сельском хозяйстве под пастбища ввиду лимитированной пригодности под выращивание растительных культур по микроэлементам, а также усиления эрозионных процессов ввиду сведения тропических лесов. Рассмотренные в данной работе равнинные и горные ферраллитные почвы были расположены на территории заповедников Кон Тю Ранг, Сонгхань, охраняемого леса Сонгхинь, национального парка Пу Мат.

Общая численность бактериальных клеток в изученных образцах красно-желтых гумусно-ферраллитных почв варьировала от 1.59 до 5.59 млрд клеток/г в гор. А, максимальные показатели зафиксированы в горной ферраллитной почве заповедника Пу Мат. Более высокие показатели были приурочены к образцам горных почв, что связано с большим содержанием в них органического вещества. В образцах опада на поверхности красно-желтых ферраллитных почв показатели численности бактерий значительно варьировали от 0.40 до 3.56 млрд клеток/г и были, в большинстве своем, выше, чем аналогичные показатели для образцов почвы. Длина актиномицетного мицелия варьировала в образцах ферраллитных почв от 280 до 670 м/г и была максимальной в горной красно-желтой гумусно-ферраллитной почве заповедника Сонгхань, ниже показатели были зарегистрированы в равнинных почвах. Исследование микробных сообществ тропических почв Вьетнама показало, что общая численность бактерий и длина актиномицетного мицелия сравнима и превышает численность бактерий в лесных почвах умеренной зоны, а также близка с аналогичными показателями для ферраллитных почв о. Кубы, изученными нами ранее. На поверхности почв в тропической зоне именно растительный опад и гор. А почв являются локусом наибольшей концентрации микробной биомассы в отличие от лесных экосистем умеренного пояса, где наибольшая численность микроорганизмов регистрируется в подстилке. В результате активной деструкции растительного материала микроорганизмами в тропических лесах Вьетнама сам горизонт подстилки не формируется, тогда как гор. А почвы, в значительной мере, несет в себе черты подгоризонта Н.

В исследованных образцах красно-желтой ферраллитной почвы и «подвешенной почвы» из корзинок эпифитных папоротников были детектированы бактериальные филумы Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, ниже содержание филумов Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Cyanobacteria. При этом представленность филумов в исследованных почвах была различной: в гор. А красно-желтой гумусно-ферраллитной почвы доминировали представители филума Proteobacteria (51%), ниже было содержание Acidobacteria (38%) и Firmicutes (8%), еще ниже было содержание других филумов. В «подвешенной почве» доминировал филум Firmicutes (80%), ниже было содержание Proteobacteria (15%), Actinobacteria (2%) и прочих филумов. Следует отметить, что в ранее исследованных нами аллювиальной почве, опаде и «подвешенной почве» были отмечены аналогичные закономерности на уровне филумов.

При изучении общего разнообразия прокариотных микроорганизмов в образцах гор. А красно-желтой гумусно-ферраллитной почвы и «подвешенной почвы» были выявлены некоторые общие закономерности. В изученных субстратах было выявлено большое количество родов бактерий, способных к деструкции ксенобиотиков (*Amaricoccus*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Skermanella* и др.). Было показано наличие большого числа бактерий, связанного с различными этапами цикла азота (*Paracoccus*, *Ensifer*, *Nocardia*, *Pseudolabrys* и др.), а также бактерий-экстремофилов, способных переживать длительные неблагоприятные условия (*Brevundimonas*, *Rubellimicrobium*, *Janthinobacterium* и др.). Также был выявлен значительный вклад в микробное сообщество изученных субстратов ацидофильных актинобактерий рода *Acidimicrobium*, что связано с низким рН исследуемых ферраллитных почв, а также «подвешенной почвы», связанной со свойствами корневых экссудатов эпифитных растений. В образце гор. А

почвы было определено большое количество родов-антагонистов развития микроскопических грибов (*Ornithinimicrobium*, *Janthinobacterium*). Исследуя сообщества на родовом уровне, стоит заметить, что сообщество «подвешенной почвы» имеет довольно низкое сходство с сообществом ферраллитной почвы – при значительном сходстве функциональных группировок микроорганизмов их родовой состав существенно различается. Наибольшее альфа-разнообразие в изученных образцах приурочено к «подвешенной почве», что подтверждается индексами Шеннона (5.17) и Симпсона (0.94). Высокое разнообразие и численность прокариотных микроорганизмов в совокупности с полученными ранее данными по количеству функциональных генов *nifH* и *alkB* позволяют прогнозировать выделение из изученных почв и сопряженных субстратов культур прокариот, применяемых целях биотехнологии и рационального природопользования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

Влияние бензина на ростовые свойства микромицетов

Ковалёва И.А., Малахова У.А.

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38274

В настоящее время к уже известным видам деградации почв (потеря гумуса, физическая деградация, накопление остатков пестицидов и их метаболитов) относят также и такой опасный фактор антропогенного воздействия, как загрязнение нефтью и продуктами ее переработки. Влияние предприятий нефтегазовой отрасли связано с выносом токсичных веществ при добыче, переработке, транспортировке сырья и продуктов переработки, которые могут влиять на почвенные экосистемы как локально, так и при переносе некоторых загрязнителей на значительные расстояния. При этом, длительное антропогенное влияние загрязняющих веществ оказывает неблагоприятное воздействие на формирование почвенных биоценозов, в том числе и микробных. Нефтепродукты являются распространенным техногенным загрязнителем, при разливах которых на длительное время нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное плодородие [1, 6].

В почве всегда содержатся некоторые бактериальные формы неустойчивых, чувствительных к нефтяному загрязнению видов микромицетов, а также типичными обитателями почв являются представители следующих родов: *Acremonium*, *Chaetomium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* [3, 7].

Цель данного исследования – изучение влияния нефтепродуктов, в частности бензина на рост почвенных микроскопических грибов.

Образцы почв для проведения микробиологических исследований отбирали в стерильные пакеты в районе автозаправочных станций г. Ставрополя.

Для получения достоверных результатов с пробной площади отбирали 4 образца почв методом случайных проб. Микробиологический анализ проводили непосредственно после отбора образцов. Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу и выделение микромицетов на агаризованной ПС Сабуро осуществляли по общепринятым методикам [5]. Пересев чистых культур проводили методом реплик. При идентификации микромицетов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств [6]. В качестве модельных микромицетов были взяты: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*. Для оценки влияния углеводов, на чашки Петри с ПС Сабуро был добавлен бензин в следующих концентрациях 1, 2, 3, 4, 5 мл соответственно. После застывания среды, стерильным пробойником сделали лунки и до спороношения аксеничных культур внесли модельные микромицеты. После этого чашки помещали в термостат при $t = +27^{\circ}\text{C}$. Результаты по вли-

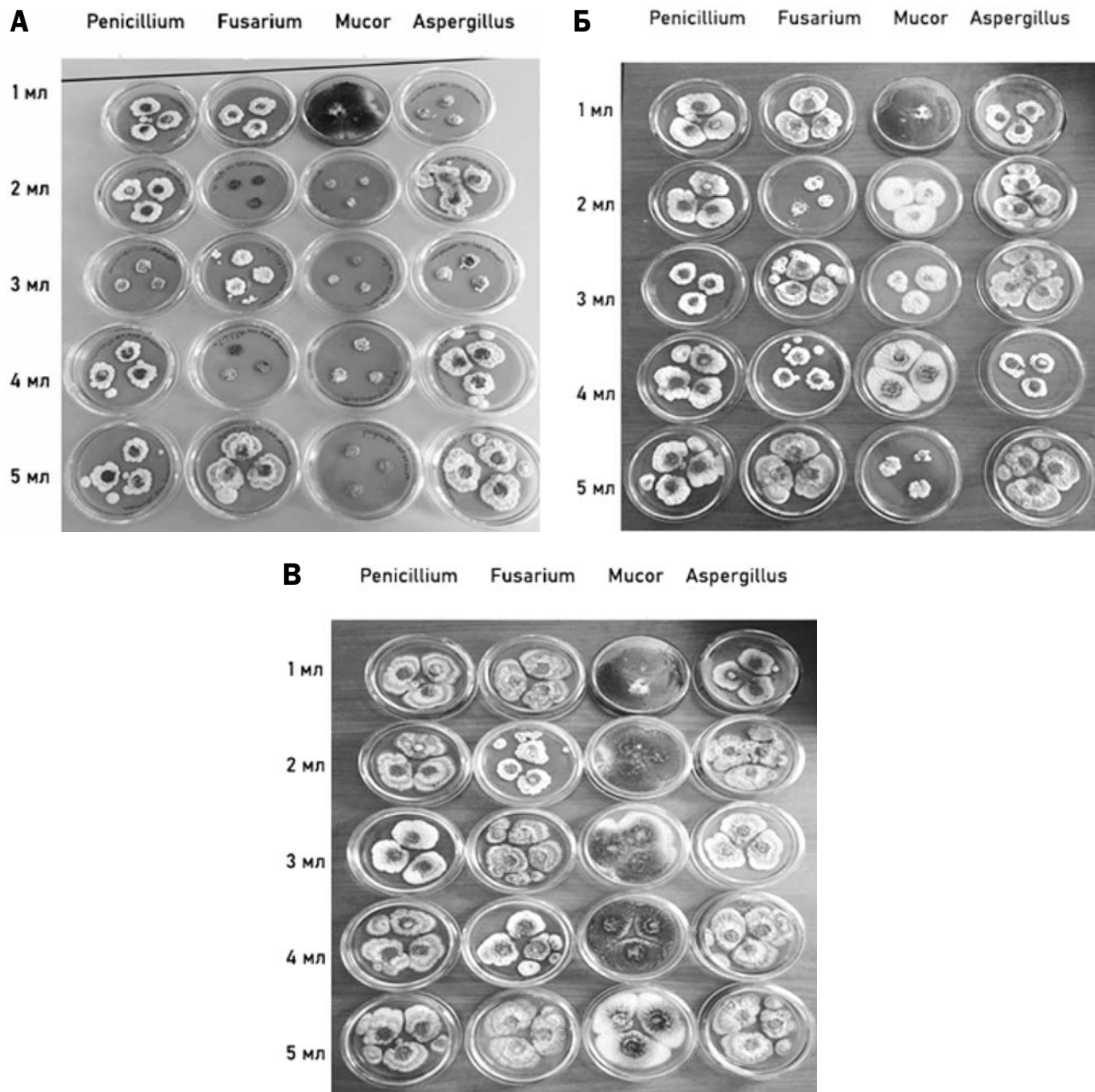


Рис. 1. Размер колоний модельных микромицетов: А – 7 сут. культивирования, В – 14 сут. культивирования, С – на 21 сут. культивирования

янию нефтепродуктов на *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium* анализировали через 7, 14 и 21 сутки культивирования.

С каждым увеличением концентрации бензина тест-культура *Aspergillus* проявляет активный рост. При максимальной концентрации в 5 мл наблюдается обильный рост культуры. При культивировании *Mucor* можно отметить, что при внесении 1 мл бензина наблюдается сплошной рост, а с увеличением концентрации он уменьшается. При культивировании *Fusarium* с концентрацией бензина от 1 до 5 мл наблюдается обильный рост. При культивировании *Penicillium* наблюдается обильный рост при всех внесенных концентрациях. Для достоверности результатов испытание каждого образца проводили в трехкратной повторности.

Таким образом, анализируя полученные данные, можно утверждать, что бензин при высоких концентрациях подавляет рост *Mucor*, а при низких даёт сплошной рост. *Fusarium* и *Penicillium* дают обиль-

ный рост при всех исследуемых концентрациях. При низких концентрациях рост *Aspergillus* значительно хуже, чем при высоких (см. рис.). Увеличение численности грибов в почве, при больших концентрациях нефтепродуктов, связаны с тем, что рН загрязненной почвы смещается в кислую область (рН 4,5–5,5), что благоприятствует росту грибов. Почвенные грибы используют нефтепродукты в качестве источника углеродного питания.

Таким образом, нефтяные загрязнения оказывают существенное влияние на качество и свойства почвы, на макрофлору и мезофауну, а также на микробиальные почвенные сообщества, которые могут приводить к трансформации микромицетов. Также исследование показывает, на селективность микромицетов и их применение в биоремедиации почвы, в зависимости от степени загрязненности участка.

Литература

1. Алиев С.А. Рекомендации по рекультивации нефтезагрязненных земель / С.А. Алиев, Д.В. Гвозденко, М.П. Бабаев, Д.А. Гаджиев. – Баку: Элм, 1981. – 26 с.
2. Киреева Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов / Н.А. Киреева, Н.Ф. Галимзянова // Почвоведение, 1995. – № 2. – С. 211–216.
3. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
4. Никитина Д.И. Почвенная микробиология: Под ред. и с предисл. Д.И. Никитина. – М.: Колос, 1979. – 316 с.
5. Пархоменко А.Н. Влияние загрязнения нефтепродуктами и серой на микрофлору почв аридной зоны: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.08 / Пархоменко Анна Николаевна. – Уфа, 2011. – 26 с.

Динамика устойчивости к антибиотикам сапрофитных стафилококков – симбионтов кожи здоровых людей

Кожина Э.В.¹, Полюдова Т.В.²

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет им. акад. Д.Н. Прянишникова»,
Kurlyuk2012@mail.ru

² «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал Пермского Федерального исследовательского центра УрО РАН
polyudova@iegm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38275

Коагулазонегативные стафилококки (КНС) являются нормальной микрофлорой кожи и слизистых оболочек человека. Чаще всего среди колонизаторов кожи встречаются представители вида *Staphylococcus epidermidis*. Вторым по распространенности видом является *S. hominis*, который преобладает на сухой коже рук, ног и туловища [1]. Представители КНС ранее считались безобидными комменсальными микроорганизмами, однако в настоящее время они рассматриваются как источники инфекций связанных, преимущественно, с долговременными медицинскими устройствами [2]. Тем не менее, стафилококки продолжают оставаться постоянными спутниками человека. Широкое применение антибиотиков при лечении заболеваний, вызванных патогенной микрофлорой, неизбежно сказывается на профиле антибиотикочувствительности резидентных стафилококков.

Целью работы явилась оценка изменения профиля чувствительности к антибиотикам представителей КНС, выделенных с кожи здоровых людей.

Выделение бактерий рода *Staphylococcus* производили из смывов кожи локтевого сгиба здоровых добровольцев возраста 20–21 года. Отбор проб с кожи одних и тех же респондентов проводили дважды с интервалом в 1 год. Сбор материала выполнялся согласно методам санитарно-бактериологиче-

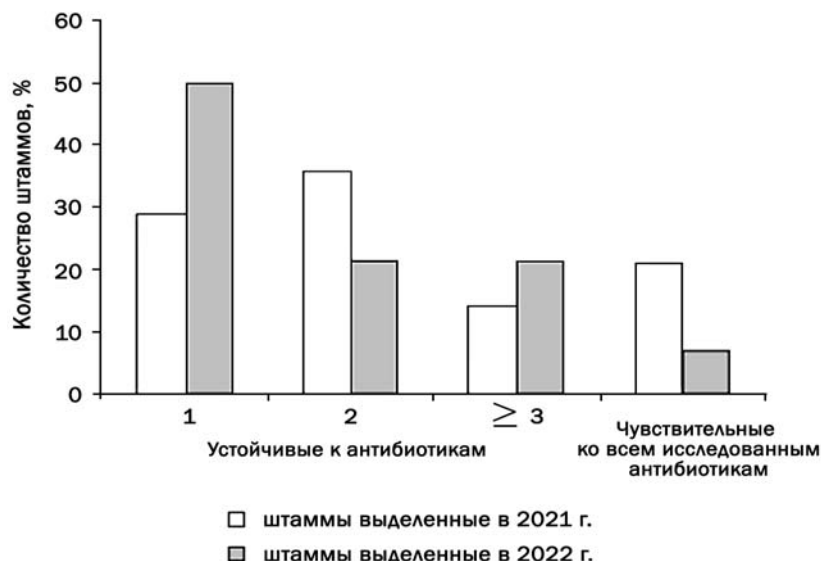


Рис. Антибиотикорезистентность бактерий КНС, выделенных с кожи здоровых людей с интервалом в 1 год

ского исследования микробной обсемененности [3]. Высев из смывов проводили по типу «штриха» на селективную питательную среду – желточно-солевой агар (ЖСА). Для дальнейших исследований отбирали только колонии, вокруг которых не наблюдалось помутнения ЖСА (без лецитиназной активности) [4]. Бактерии КНС переносили в жидкую среду Luria Bertani для получения накопительных культур, которые использовали для постановки диско-диффузионного теста для определения чувствительности к антибиотикам. В исследовании использовались стандартные бумажные диски с 10 антибиотиками («НИЦФ», СПб). Результаты диско-диффузионного метода интерпретировали согласно методическим указаниям [5].

Как показали проведённые исследования, стафилококки, выделенные в оба срока отбора, были чувствительны к ванкомицину, гентамицину, канамицину и ципрофлоксацину. Бактерии всех штаммов КНС, выделенные с кожи на первом этапе исследования были чувствительны к оксациллину, однако через год бактерии 21% штаммов оказались устойчивы к данному антибиотику.

Наименее эффективным антибиотиком в отношении сапрофитных КНС был бензилпенициллин. На первом этапе исследований резистентностью к нему обладали 71% выделенных КНС, через год было обнаружено 86% штаммов КНС, бактерии которых были устойчивы к бензилпенициллину. В 2 раза увеличилось количество штаммов устойчивых к линкомицину и левомецетину. Неожиданные результаты были получены при оценке устойчивости стафилококков к эритромицину. Так, первоначально было выявлено 50% штаммов, резистентных к этому антибиотику. При повторном выделении КНС было получено лишь 29% штаммов, бактерии которых были устойчивы к эритромицину, при этом 43% штаммов характеризовались промежуточной, или умеренной устойчивостью к данному макролиду.

В целом, результаты исследования демонстрируют существенное увеличение доли полирезистентных бактерий. Количество штаммов КНС, выделенных при первичном скрининге, чувствительных ко всем использованным в работе антибиотикам соответствовало 21%, тогда как повторные исследования, проведённые через год, выявили лишь 7% штаммов, бактерии которых обладали чувствительностью ко всем антибиотикам, использованным в работе (рис.).

Помимо возрастания доли резистентных штаммов КНС, выделенных в разные периоды, увеличилось, и количество антибиотиков к которым стафилококки проявляли умеренную устойчивость.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о наличии перманентного воздействия антибиотиков на организм человека и его микрофлору, что является фактором отбора и передачи генов резистентности среди представителей условно-патогенных бактерий.

Литература

1. Huebner J., Goldmann D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens // Annu. Rev. Med. 1999. V. 50, P. 223–236. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1146/annurev.med.50.1.223. PMID: 10073274.

2. *Bogut A., Magryś A.* The road to success of coagulase-negative staphylococci: clinical significance of small colony variants and their pathogenic role in persistent infections // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021. V.40(11), P. 2249–2270. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1007/s10096-021-04315-1.
3. МР 4.2.0220-20. 4.2. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды // *КонсультантПлюс* : справочная правовая система.
4. *Нежвинская О.Е., Дудчик Н.В., Коломиец Н.Д. и др.* Методы оценки эпидемиологической значимости условно-патогенной микрофлоры // *Здоровье и окружающая среда.* 2015. Т. 1. № 25. С. 69–71.
5. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200038583>.

Автохтонные микроорганизмы засоленных почв Республики Казахстан

Кондрашова М.М.¹, Ванькова А.А.¹, Дренова Н.В.³, Ибраева М.А.²

¹ Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия имени К.А.Тимирязева,
kondrashovamn@yandex.ru

² ТОО «Казахский научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова»

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38276

Гумусовые соединения разлагаются группировкой микроорганизмов, названной С.Н. Виноградским автохтонной. Гумус представляет собой комплекс разных по сложности соединений, весьма стойких к воздействию микроорганизмов. Накопленные отмершие растительные остатки в виде подстилки содержат большой запас элементов питания. Их могут использовать растения и микроорганизмы, либо они могут преобразовываться в гумусавые вещества. Поэтому при недостаточном поступлении в почву растительных остатков содержание гумуса в ней существенно снижается, в основном за счет фульвокислот [5]. М.А. Ибраевой с соавторами [3] было проведено почвенно-агрохимическое обследование территории 90 фермерских хозяйств общей площадью 1500 га, после чего были составлены карты, отражающие содержание гумуса и основных элементов питания. 99,0% или 1485,4 га обследованной территории имеют очень низкое содержание гумуса. Это свидетельствует о деградации почв, одним из факторов которой является дегумификация.

Автохтонная группировка микроорганизмов до настоящего времени остаётся малоизученной. Актуальность данного исследования связана с возможностью использования данных микроорганизмов в качестве информативного показателя гумусного состояния данных почв в процессе эколого-биологического мониторинга, при планировании агротехнических мероприятий и оценке их эффективности [1].

Целью исследования являлось выявление и идентификация микроорганизмов, способных разлагать гумус в почвах различной степени засоления р. Казахстан. Объектами исследования являлись образцы лугово-серозёмной почвы разной степени засоленности, отобранные из пахотного слоя близ села Шаульдер, Туркестанская область, респ. Казахстан. В ходе исследования было использовано 3 типа почв: очень сильно- (5 группа по засоленности), средне- (3 группа по засоленности) и слабозасоленная (2 группа по засоленности) почвы с содержанием гумуса 0,39%; 1,09% и 0,81% соответственно. Отбор почвенных образцов проводился в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 [2]. В ходе исследования определена численность автохтонных микроорганизмов в почвах методом поверхностного посева на селективную питательную среду – нитритный агар, выделено на основании культуральных признаков 25 морфотипов микроорганизмов, проведена их идентификация методом ПЦР с использованием универсального праймера 8ua.

Учёт численности микроорганизмов проводился в 3 повторностях на каждый тип почвы в 7 полях зрения из разведения 10^{-3} , затем определено число колоний на одну чашку Петри [4, с. 157]. Определена численность микроорганизмов в КОЕ/г гумуса, средние значения составляют: $129,8 \cdot 10^6$ для слабозасоленной почвы; $46,2 \cdot 10^6$ для средnezасоленной почвы; $163,4 \cdot 10^6$ для очень сильнозасоленной почвы; также определена численности микроорганизмов в КОЕ/г абс. сухой почвы: слабозасоленная почва – $105,1 \cdot 10^4$, средnezасоленная почва – $50,3 \cdot 10^4$, очень сильнозасоленная почва – $58,0 \cdot 10^4$.

В ходе секвенирования получены результаты по 18 морфотипам из 25. В качестве доминирующих микроорганизмов представлены бактерии следующих классов: Actinomyceta, спорообразующие бактерии класса Bacilli, γ -Proteobacteria, Rubrobacteria. Доминирующие бактерии класса Actinomyceta были выделены некоторыми исследователями, в частности Е.З. Теппер, в специфическую группировку автохтонных микроорганизмов, которые смогли приспособиться к росту и развитию с использованием гуминовых кислот в качестве источника углерода и азота [5]. Представители различных родов, принадлежащих к данным классам микроорганизмов, встречаются во всех изученных образцах засоленных почв, при этом наибольшее разнообразие отмечается в образце слабозасоленной почвы. Это утверждение позволяет предположить, что степень засоления почв оказывает влияние на численность микроорганизмов: с увеличением степени засоления их численность снижается, вместе с этим степень засоления влияет на разнообразие микроорганизмов, способных разлагать гумус. Также между содержанием гумуса и численностью микроорганизмов прослеживается обратная зависимость, что свидетельствует об их участии в процессе минерализации гумусовых веществ.

Литература

1. Автохтонные микроорганизмы в мониторинге состояния почв при органическом земледелии / В.И. Кулагина, Л.М. Сунгатуллина, С.С. Рязанов [и др.] // Проблемы и мониторинг природных экосистем: сборник статей VIII Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 70-летию Пензенского государственного аграрного университета, Пенза, 13–14 октября 2021 года. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2021. – С. 90–92.
2. ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы (ССОП). Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.
3. Минеральное питание и продуктивность кукурузы на зерно в условиях засоленных лугово-серозёмных почв Шаульдерского массива орошения / М.А. Ибраева, А.С. Сапаров, А.И. Сулейменова, [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2020. – № 1. – С. 16–28.
4. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева; Под ред. В.К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. И доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.: ил.
5. Теппер Е.З. Микроорганизмы рода Nocardia и разложение гумуса: монография / Е.З. Теппер. – М.: ИНФРА-М, 2020. – 224 с.

Антагонистическая активность клинических изолятов коагулазонегативных стафилококков

Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал Пермского Федерального исследовательского центра УрО РАН,
polyudova@iegm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38277

Продукция бактериоцинов клиническими штаммами стафилококков может играть существенную роль в бактериальной колонизации госпитальных пространств. Важнейшим инструментом этого процесса является секреция в окружающую среду низкомолекулярных катионных пептидных соединений, обладающих, как правило, широким спектром ингибирующего действия, как в отношении близкород-

ственных видов, так и представителей других родов грамположительных бактерий [1]. В настоящее время представляется, что бактериоциногенная коагулазонегативных стафилококков является широко распространенным явлением [2].

Цель работы – изучение распространенности феномена продукции низкомолекулярных антибактериальных соединений пептидной природы среди клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков.

За период с 2005 по 2020 гг. было исследовано 9952 штамма коагулазонегативных стафилококков (КНС), выделенных в бактериологической лаборатории МУЗ Городская клиническая больница № 7 г. Перми с различных объектов родильных стационаров. Идентификацию стафилококков проводили с использованием набора StaphyTest 24 (Чехия). Для выявления антибактериальной активности (АБА) КНС, их выращивали на жидкой обогащенной питательной среде [3] при 37 °С с аэрацией в течение 15–18 ч. Клетки осаждали, надосадочные жидкости стерилизовали ультрафильтрацией и исследовали их АБА методом диффузии в агарозу. В расплавленную и охлажденную до 42 °С агаризованную среду вносили суспензию тест-бактерий *S. cohnii* ВКМ-3165 (10^5 КОЕ/мл), распределяли в чашке Петри. На поверхность агарозного слоя наносили по 5 мкл исследуемых ультрафильтратов сред роста КНС, подсушивали и инкубировали при 37 °С 16–18 ч. О наличии АБА судили по формированию зон подавления роста в местах аппликации культуральных жидкостей. Количественный анализ АБА проводили с помощью метода двукратных серийных разведений. За условную единицу (ЕА) АБА принимали обратную величину максимального разведения, при котором наблюдалось полное торможение роста тест-бактерий. Природу АБА устанавливали с помощью обработки ультрафильтратов сред культивирования КНС, обладающих АБА различными гидролазами [3]. Для выделения бактериоцинов использовали ионообменную хроматографию [3]. Масс-спектрометрический анализ пептидного состава проводили на Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Perseptive Biosystems).

За период проведения скрининга на способность к продукции антибактериальных соединений антагонистическая активность по отношению к тест-бактериям *S. cohnii* ВКМ-3165 была выявлена у представителей 209 штаммов КНС. Таким образом, нами было показано, что среди госпитальных изолятов КНС более 2% обладают способностью к продукции антибактериальных соединений.

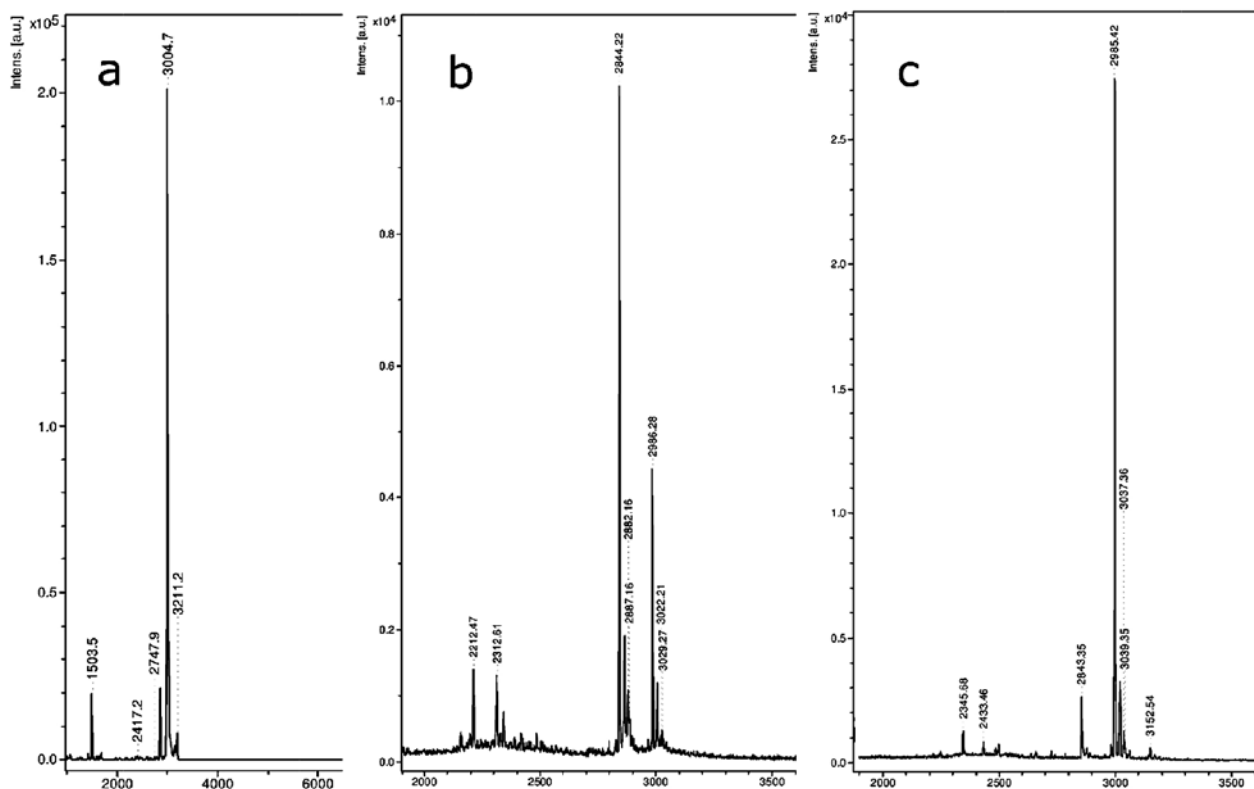


Рис. Масс-спектры антибактериальных пептидов, выделенных из сред культивирования *S. haemolyticus* 117 (a), *S. hominis* 405 (b) и *S. warneri* 1535 (c)

Путем протеолитической обработки полученных ультрафильтратов сред культивирования бактерий-продуцентов установлено, что АБА полностью исчезает после воздействия трипсином и протеиназой К и снижается в 2–4 раза после действия пепсина. Обработка ультрафильтратов ДНКазой и РНКазой не оказывала влияния на их АБА. Следовательно, выявляемая АБА обусловлена соединениями пептидной природы.

Биохимическая идентификация 30 продуцентов с АБА культуральных жидкостей более 256 ЕА показала, что 12 штаммов принадлежали виду *S. warneri*, 11 штаммов – *S. cohnii*, 5 штаммов – *S. haemolyticus* и по 1 штамму видов *S. epidermidis* и *S. hominis*.

Выделенные фракции антибактериальных пептидов трёх штаммов *S. haemolyticus* 117, *S. hominis* KLP-1 [4] и *S. warneri* 1535 были исследованы с помощью масс-спектроскопического анализа. Было показано, что антибактериальный пептид бактерий *S. haemolyticus* 117 обладает мол. массой 3004,7 Да, хоминин [5] имеет массу 2985 Да, а пептид *S. warneri* 1535–2998 Да (рис.).

Таким образом, показано, что среди исследованных штаммов КНС более 2% являются продуцентами антибактериальных соединений. Антибактериальная активность этих стафилококков обусловлена выделением в среду роста низкомолекулярных пептидных соединений, подавляющих развитие близкородственной микрофлоры. Развитие бактерий с высокой антагонистической активностью, вероятно, способствует их распространению и доминированию в полимикробной среде.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКТР АААА-А19-119112290009-1

Литература

1. de Freire Bastos M., Ceotto H., Varella Coelho M.L., Nascimento J.S. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. V. 10. P. 38–61.
2. de Freire Bastos M., Miceli de Farias F., Carlin Fagundes P. et al. Staphylococci: an update on antimicrobial peptides produced by staphylococci and their diverse potential applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 10339–10368.
3. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. 2010. № 2. С. 228–238.
4. Патент № 2428470 С1 РФ. Штамм *Staphylococcus hominis* klp-1 – продуцент низкомолекулярных пептидных соединений, ингибирующих развитие грамположительных бактерий / В.П. Коробов, Л.М. Лемкина, Т.В. Полюдова.
5. Патент № 2528055 С2 РФ. Антибактериальный пептид хоминин klp-1 широкого спектра действия / В.П. Коробов, Л.М. Лемкина, Т.В. Полюдова.

Видовой состав микромицетов, ассоциированных с растениями рапса озимого некоторых регионов России

Костин Н.К.^{1,2}, Кузнецова А.А.¹, Дудченко И.П.¹, Шухин Д.И.¹, Сердюк О.А.³

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
р.п. Быково, г. Раменское, Московская обл.,
kuznec@bk.ru

² ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва

³ ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур
им. В.С. Пустовойта», Краснодар

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38278

Рапс или кольза (*Brassica napus* L.) – экономически значимая однолетняя культура семейства Капустных (*Brassicaceae*), выращиваемая в промышленных масштабах во многих регионах России в основном на масличные и технические цели [1].

В России за последние тридцать лет выращивание рапса претерпело изменения от нишевой культуры, требующей дальнейшей переработки, до одной из перспективных культур. За прошедшие 10 лет площади возделывания рапса в нашей стране увеличились в два раза [2]. По данным Росстата посевная площадь рапса в России в 2011 г. составляла 894 тыс. га, а в 2021 г. увеличилась до 1,68 млн га, больше на 13,2% (на 196,4 тыс. га), чем в 2020 г., при рекордной урожайности 2,6 млн т [3]. Основные площади возделывания рапса сосредоточены в Сибири: Красноярский край – 179,7 тыс. га, Алтайский край – 161,6 тыс. га, Новосибирская область – 104,7 тыс. га [4].

Главной причиной снижения урожайности и низкого качества семян рапса являются грибные болезни. Одним из распространенных заболеваний в нашей стране является фомоз рапса, вызванный двумя возбудителями – *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not и *Leptosphaeria biglobosa* Shoemaker & H. Brun. В рамках экспорта российской продукции АПК страны-импортеры, в частности Китай, выставляют фитосанитарные требования на отсутствие вида *L. maculans* Ces. & De Not в подкарантинной продукции рапса. В связи с этим своевременный фитосанитарный контроль состояния семенного и посадочного материала, основанного на быстром обнаружении и точной идентификации патогена, является приоритетной задачей специалистов, работающих в исследовательских лабораториях.

Целью исследования в рамках выполнения Госзадания по выявлению *L. maculans* являлось определение и изучение микромицетов, ассоциированных с растениями рапса, некоторых регионов России. Материалом являлись растения озимого рапса, отобранные в результате обследования 2022 года районов Рязанской, Тульской, Ростовской областей и Краснодарского края. В процессе работы были изучены культурально-морфологические особенности целевого вида *L. maculans* и его близкородственного вида *L. biglobosa*, а также видов, вызывающие сходные симптомы на растениях рапса. Выделенные в ходе работы изоляты исследовались в бесполой стадии их развития.

При визуальном осмотре отбирались растения с некротизированными участками растительной ткани (листья, стебли, стручки) с последующей закладкой их на питательную среду КГА с рН 5,0 и добавлением 1% стрептомицина. Культивирование проводили в термостате при температуре 25 °С. Развившиеся морфологические структуры микромицетов пересевали на новые питательные среды. Измерение спор осуществляли в 3-х кратной повторности по 100 раз с определением средней арифметической величины. Для подтверждения микромицетов проводили классическую ПЦР с секвенированием по Сэнгеру участка ITS рДНК с установлением видовой принадлежности нуклеотидных последовательностей с использованием сравнительной базы эталонных штаммов NCBI программой BLAST [5].

В ходе исследования на образцах стеблей рапса Краснодарского края были выявлены симптомы, вызванные пикнидиальными грибами, которые характеризовались вытянутыми пятнами бежевого цвета, окруженными темно-коричневой каймой, а также наблюдались участки с полным потемнением ткани на всей поверхности с многочисленными мелкими черными пикнидами. В результате идентификации морфологических структур микромицетов была установлена принадлежность грибов к возбудителям фомоза рапса видам *L. maculans* и *L. biglobosa*. Два вида, вызывающие фомоз рапса присутствовали вместе на одних стеблях, но отличались между собой по культурально-морфологическим признакам.

Начальный рост вида *L. maculans* характеризовался слабо опушенным бежевым мицелием, с одиночными или собранными в группу, погруженными и полупогруженными темными пикнидами, без образования субстратной пигментации, зачастую колония имела хризантемовидный рост. После 14 дня культивации воздушный мицелий темнел, приобретая серо-коричневый цвет с образованием покоящего мицелия и хламидоспор. Пикноспоры гиалиновые, несептированные, преимущественно овальные, одиночно встречались вытянутые или слегка изогнутые, с закругленными с обеих сторон концами или с одной, размером в среднем $3,92 \times 1,69$ мкм (рис. 1).

Близкородственный вид *L. biglobosa* отличался своим культуральным ростом и строением морфологических структур от *L. maculans*, имея слабо опушенный коричневый мицелий с многочисленными разбросанными по всей поверхности полупогруженными и поверхностными одиночными темно-коричневыми пикнидами с выделением в субстрат пигмента оранжево-лимонного цвета. Пикноспоры светло-бежевого цвета, несептированные, преимущественно овальные или округлые, с закругленными с обеих сторон концами или с одной, одиночно встречались грушевидной формы, размером в среднем $3,94 \times 2,66$ мкм (рис. 2).

Следует отметить, что в ходе работы гриб *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not, вызывающий некрозы, отмирание листьев и стеблей у древесных культур, был выделен со стеблей и стручков

растений рапса юга России (Ростовская область и Краснодарский край). Колония *B. dothidea* характеризовалась обильным войлочным темно-серым воздушным мицелием, с дальнейшим формированием погруженных в субстрат пикнид темного цвета. Пикноспоры гриба гиалиновые, несептированные, веретеновидной формы, удлинненные с расширенной серединой и сужающиеся в обоих сторон, размером в среднем $23,5 \times 5,8$ мкм (рис. 3).

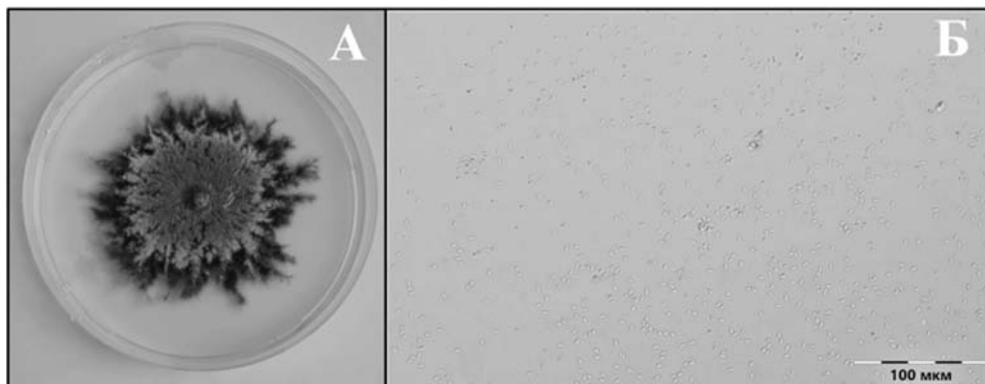


Рис. 1. Чистая культура (А) и пикноспоры вида *L. maculans* (Б)

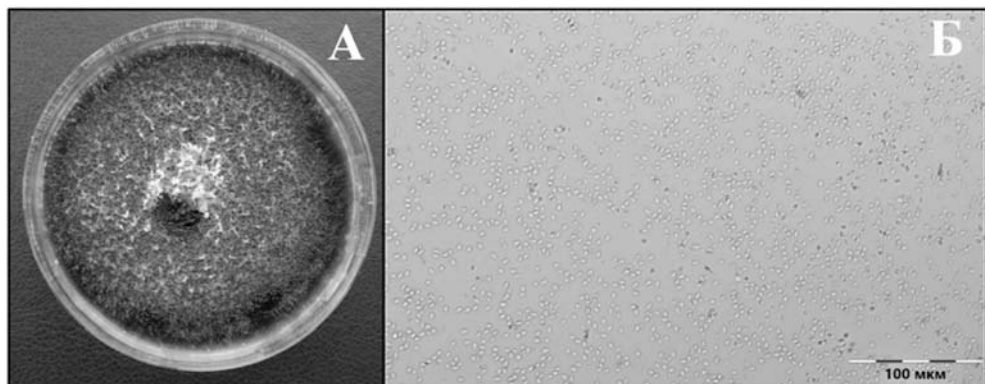


Рис. 2. Чистая культура (А) и пикноспоры вида *L. biglobosa* (Б)

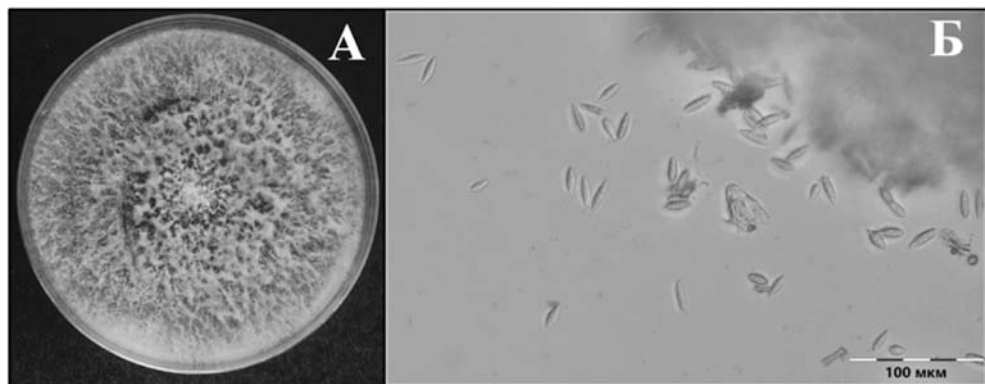


Рис. 3. Чистая культура (А) и пикноспоры вида *B. dothidea* (Б)

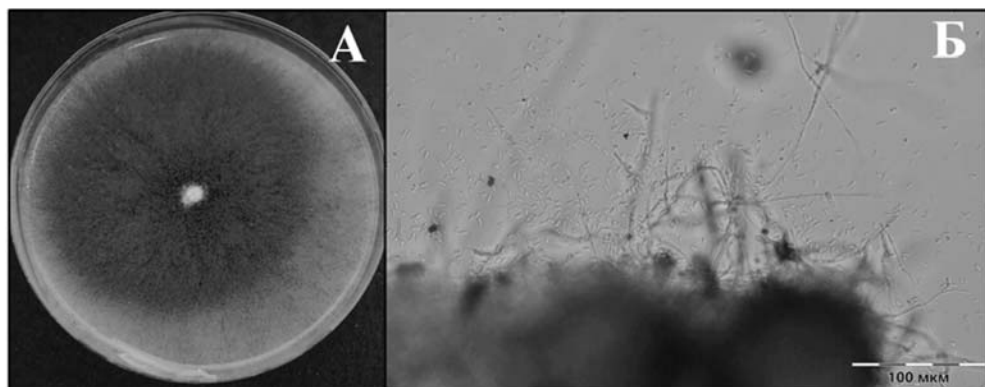


Рис. 4. Чистая культура (А) и пикноспоры вида *P. herbarum* (Б)

С образцов листьев рапса Рязанской области также был идентифицирован вид *Phoma herbarum* Westend, который отмечался серо-бурыми пятнистостями неправильной формы с образованием мелких черных пикнид. На питательной среде чистая культура имела темно-коричневый цвет, паутинистый мицелий, расплзающийся от центра колонии по всей поверхности субстрата многочисленными поверхностными мелкими черными пикнидами. Внутри пикнид формировались гиалиновые, несептированные пикноспоры, округлой или овально-удлиненной формы, размером в среднем 5,6×2,5 мкм, крупнее чем у *L. maculans* и *L. biglobosa*, но меньше чем у *B. dothidea* (рис. 4).

Отмечено присутствие других микромицетов во всех исследуемых регионах на растениях рапса – группы рода *Alternaria* (*A. sect. Alternata*, *A. sect. Infectoria*); видов *A. japonica* Yoshii и *A. brassicae* (Berk.) Sacc. на образцах стеблей Ростовской области; видов рода *Fusarium* – *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. lateritium* Nees, *F. oxysporum* complex, а также гриба *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, выделенных с образцов стеблей Тульской области; вида *Botrytis cinerea* Pers., выделенного вместе с грибами рода *Phoma* со стеблей Краснодарского края.

В результате исследований на предоставленном растительном материале был установлен видовой состав микромицетов порядка Ruzhniales и других сопутствующих видов. В ходе работы с растений рапса озимого были выделено 55 изолятов 14-ти видов патогенных грибов различной географической локации.

Определены методы выделения и идентификации возбудителя фомоза рапса вида *L. maculans*, что является основой для точной диагностики в рамках предотвращения проникновения и распространения гриба с зараженной подкарантинной продукцией рапса на территории стран-импортеров.

Литература

1. Горлов С.Л. Перспективы развития производства рапса в Российской Федерации / Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2006. – № 2(135). – С. 139–142.
2. Баюров Л.И. Рапс – культура будущего! / Год науки и технологий 2021: Сборник тезисов по материалам Всероссийской научно-практической конференции – Краснодар: КубГАУ, 2021. – С. 36.
3. Росстат. – URL: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/S-X_2021.pdf
4. ТОП-5 регионов России по возделыванию рапса – URL: <https://glavagronom.ru/news/nazvany-top-5-regionov-rf-po-sboru-rapsa>
5. National Center for Biotechnology Information. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Изучение микробиома шлам-лигнина и субстратов на их основе после твердофазной ферментации для создания почвогрунтов

Кочаровская Ю.Н.¹, Севостьянов С.М.², Демин Д.В.^{2,3}, Делеган Я.А.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
kocharovskayaj@mail.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН)

³ ФГБНУ «Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Фитопатологии»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38279

В результате деятельности лесоперерабатывающей промышленности накапливаются многотоннажные отходы, которые зачастую вывозят в отвалы или сжигают, что создает негативную техногенную нагрузку на окружающую среду [1; 2]. До настоящего времени разработка методов утилизации шлам-лигнина ведется, в основном, в направлении сжигания коллоидного осадка, хотя оно не является экологически эффективным по ряду причин: сжигание уменьшает только объем отхода – осадка, причем полученная

зола отправляется на те же территории складирования, которые продолжают негативно воздействовать на окружающую среду; при сжигании происходит выброс целого ряда загрязняющих веществ [3]. В этой связи проблема утилизации и рекуперации коллоидных иловых осадков, образующихся от целлюлозно-бумажной промышленности, до сих пор остается актуальной и требует дальнейших исследований. Одним из основных компонентов отходов является лигнин. Его основными чертами как макрополимера считаются аморфная структура и устойчивость к химической и микробной деполимеризации. В связи с гетерогенностью химической структуры лигнина способы его катаболизма микроорганизмами также различны [4]. Данная работа направлена на изучение микробных аборигенных сообществ, формирующихся в отходах предприятий деревообрабатывающей промышленности.

Для проведения исследования отобраны пробы (1.1, 1.2, 3, 4) на территории хранилищ-карт на побережье Байкала Иркутской области, заполненных шлам-лигнином, который является отходами Байкальского целлюлозно-бумажного комбината. В модельных экспериментах с применением метода твердофазной ферментации были переработаны образцы шлам-лигнина в субстраты для создания почвогрунтов, из этих субстратов были отобраны пробы 5.1, 5.2, 8.1, 8.2. ДНК из образцов выделяли с помощью набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, UK) по стандартному протоколу. Библиотеки для секвенирования полных метагеномов готовили с помощью набора реактивов MGIEasy Universal DNA Library prep kit. Секвенирование выполнено на оборудовании DNBSEQ G400. Прочтения, соответствующие человеческой ДНК, удаляли с помощью программы BMTagger. Повторяющиеся прочтения удалены clumpify из пакета bbmap. Для контроля качества использовалась программа FastQC. Адаптерные последовательности, низкого качества ($Q < 10$) и короткие (< 100 п.н.) удалены с помощью Trimmomatic ver. 0.38. Количество сырых прочтений варьировало от 66084212 до 291381631, после предобработки осталось от 63183758 до 284237493 прочтений. Сборка сырых прочтений выполнена с помощью Megahit software v. 1.2.9. Контиги короче 500 п.н. удалены. В результате общая длина сборки составила 639313489 – 1396523298 п.н., процент оставшихся контигов более 500 п.н. от общего количества варьировал от 36,24% до 49,29%. Полноту использования прочтений при сборке оценивали посредством картирования предобработанных прочтений на полученные сборки. Картирование выполнено в программе Bowtie2 в режиме very-sensitive-local. Так полнота использования сырых прочтений в сборке варьировала от 29,54% до 93,76%, максимальная длина первого контига составила 940684 п.н., минимальная – 92737 п.н., N50 во всех образцах находился в диапазоне от 910 п.н. до 2820 п.н. Собранные метагеномы, содержащие контиги длиной больше 500 п.н., обрабатывали с помощью MG-RAST. Кодированные последовательности ДНК (CDS) были предсказаны с использованием prodigal версии 2.6.3. Функциональная аннотация выполнялась с использованием версии Diamond версии 2.0.13 и базы данных KEGG, а для таксономического присвоения использовали Kaiju version 1.7.3. Визуализацию данных проводили с помощью Krona.

Во всех образцах бактерии являются доминирующими прокариотами, среди них преобладают протеобактерии. Учитывая, что у протеобактерий распространена способность к утилизации лигнина, их высокая численность в сообществах ожидаема. Протеобактериям соответствует 46–58% всех бактериальных прочтений. По сходству структуры бактериальных сообществ в целом образцы могут быть объединены следующим образом: 1) 3 и 4; 2) 1.1, 1.2, 5.1, 8.1; 3) 5.2; 4) 8.2. Представители *Terrabacteria* распространены во всех образцах. Однако их доля не превышает 16%, что значительно ниже, чем протеобактерий. Полученные результаты по разнообразию и представленности бактерий в сообществах согласуются с аналогичными работами [5], где также отмечено, что наиболее выраженным генетическим потенциалом для деградации лигнина обладают *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*. Присутствует незначительное количество прочтений, соответствующих вирусам, их количество варьирует от 0,05% до 0,2% от общего количества прочтений. Представленность вирусов сходна во всех образцах. Археи обычно являются значимой частью почвенных сообществ, однако в данных образцах их немного (0,4–1% прочтений всех клеточных организмов). Во всех образцах, кроме 1.1, структура архейного сообщества похожа. Доминируют *Euryarcheota* (66–79% всех архей) и археи TACK-группы (17–25% всех архей). В образце 1.1 *Euryarcheota* составляют только 52% всех архей, зато археи TACK-группы – 41%. Возможно, это связано с более благоприятными условиями в грунте образца 1.1 для представителей TACK-группы.

Полученные результаты расширяют имеющиеся в мировом научном сообществе сведения о биоразнообразии микробных сообществ в отходах деревообрабатывающей промышленности. Полнометагеном-

ное секвенирование позволило установить разнообразие бактерий, архей и вирусов в образцах грунта, содержащего лигнин. Установлено, что на уровне представленности таксонов кардинальных различий между микробиомами образцов нет. Доминирующие представители сообществ являются типичными для грунта, содержащего лигнин, полученные результаты согласуются с уже известной информацией о подобных сообществах.

Литература

1. *Harkim J.M., Rowe J.W.* Bark and its possible uses. Madison: U.S. Department of Agriculture. WIS. FPL-091: 1971. 56 p.
2. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping / Y. Wang, Q. Liu, L. Yan, Y. Wang, W. Wang // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 139. P. 113-119.
3. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутской области в 2016 г. – Иркутск: Изд-во: ООО «Мегапринт», 2017 г. – 274 с.
4. *Fuchs G., Boll M., & Heider J.* (2011). Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 803–816. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1038/nrmicro2652>
5. *Lacerda Júnior G.v., Noronha M.F., de Sousa S.T.P., Cabral L., Domingos D.F., Sáber M.L., de Melo I.S., & Oliveira V.M.* (2017). Potential of semiarid soil from Caatinga biome as a novel source for mining lignocellulose-degrading enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6). <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1093/femsec/fix075>.

Разнообразие зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы»

Кривина Е.С., Темралеева А.Д.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт Физико-Химических и Биологических Проблем РАН),
pepelisa@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38280

Род *Chlorella* sensu lato, впервые описанный М.В. Бейеринком в 1890 году, является архетипом одноклеточных зеленых микроводорослей (Chlorophyta). Изначально к нему относили все мелкие (<10 мкм) коккоидные одноклеточные зеленые микроводоросли из водных местообитаний. Хотя история изучения данной группы насчитывает более 130 лет, в систематике *Chlorella*-подобных микроводорослей существует много пробелов. Скудность морфологических признаков, с одной стороны, и высокая фенотипическая пластичность некоторых из них (например, формирование колоний, продуцирование щетинок, образование слизи) в зависимости от условий окружающей, с другой, в ряде случаев делают практически невозможной правильную идентификацию таких «маленьких зеленых шариков» с помощью световой микроскопии (Luo et al., 2010). При этом данные организмы нуждаются в детальном изучении, так как они выполняют важные экологические функции в экосистемах, активно участвуя в процессах синтеза органического вещества, фотосинтетической азотации и процессах самоочищения. Исследование данной группы имеет также практический интерес, поскольку ряд *Chlorella*-подобных водорослей обладают высоким биотехнологическим потенциалом и могут быть использованы для очистки сточных вод, производства биотоплива, кормов животных, биологически активных добавок (БАД), медицинских и косметологических препаратов, а также в качестве удобрений в растениеводстве (Adar et al., 2016). В настоящее время существует огромное количество различных препаратов, содержащих либо только *Chlorella vulgaris*, либо в сочетании с другими микроводорослями. Точная таксономическая идентификация в составе таких препаратов весьма актуальна, поскольку биотехнологически значимые харак-

теристики у представителей различных видов, несмотря на сходную морфологию, могут существенно варьировать. Цель данной работы – провести таксономическую идентификацию штаммов *Chlorella*-подобных микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы», с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализов.

Объектами данного исследования стали 19 штаммов зеленых микроводорослей, выделенные из 6 биопрепаратов: 1) напиток «Зеленое солнце» (ООО «Зеленое Солнце», Пермский край: штаммы ZS1, ZS3, ZS4, ZS9); 2) удобрение «Гера» (ООО «Гера», Московская область: штаммы G1, G4, G5, G6, G7); 3) удобрение «Биоабсолют» (ООО НПО «БиоТехнология», Московская область: штаммы Ab4, Ab5); 4) органический напиток «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область: штаммы ChloN2, ChloN3, ChloN4); 5) удобрение «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область: штаммы S2, S3, S8); 6) удобрение «StimGarden» (ООО «Дело», Пензенская область: штаммы St1, St6). Изоляция и культивирование штаммов, морфологический и молекулярно-генетический анализ осуществляли по стандартным методикам, подробно описанным в статье Кривиной, Темралеевой (2022).

В ходе исследования было установлено, что в составе каждого из исследуемых биопрепаратов действительно были обнаружены микроводоросли либо из *Chlorella*-клады, либо из сестринской к ней *Parachlorella*-клады. Собственно *C. vulgaris* (штаммы S3, ZS1, ChloN4, Ab5) были обнаружены в 4-х препаратах – напитках «Зеленое солнце» и «Живая хлорелла», удобрениях «Биоабсолют» и «Живая хлорелла». В 2-х препаратах *C. vulgaris* не была обнаружена. Из наиболее близких к ней видов была встречена *C. sorokiniana* в напитке «Зеленое солнце» (штамм ZS9) и в удобрении «Гера» (штамм G1), *Planktochlorella nurekis* – в удобрении «StimGarden» (штамм St1) и в напитке «Живая хлорелла» (штаммы ChloN2 и ChloN3). При этом, ни один из коммерческих препаратов не являлся монокультурой, как это было заявлено производителями. Так среди выделенных штаммов, которые хотя бы на какой-то из стадий своего жизненного цикла обладают *Chlorella*-подобным морфотипом, были обнаружены представители видов *Edaphochlorella mirabilis* (штаммы S2, ZS3, G4), *Chloroidium saccharophilum* (штамм St6), *Coelastrella aeroterrestica* (штаммы S8, Ab), *Edaphochloris andrejevae* (штаммы ZS4, G6), *Muriella terrestris* (штамм G7), *Chromochloris zofingiensis* (штамм G5). В целом, наиболее богатым видовой состав *Chlorella*-подобных водорослей был в удобрении «Гера» и напитке «Зеленое солнце», наиболее бедным – в удобрении «Биоабсолют». В составе изученных биопрепаратов также были встречены диатомовые водоросли и цианобактерии, а также гифы и цисты микроскопических грибов, что, возможно, является следствием контаминации исходной культуры в производственных условиях. Это касалось не только удобрений, но и напитков, употребляемых непосредственно в пищу. Еще раз отметим, что правильная идентификация штаммов с *Chlorella*-подобным морфотипом весьма затруднительна вследствие скудности и неинформативности морфологических признаков, а также высокой фенотипической пластичности. В связи с этим контроль качественного состава микроводорослей биопрепаратов нельзя осуществлять только при помощи световой микроскопии, необходимо привлекать современные молекулярно-генетические методы. При наличии альгологически чистой культуры наиболее надежным и эффективным методом идентификации может стать амплификация в качестве ДНК-баркода ITS2 с последующим секвенированием по Сэнгеру. В случае смешанных культур, которыми оказались изученные биопрепараты, чтобы избежать длительного этапа очистки и получения отдельных штаммов, необходимо использовать амплификацию того же ДНК-баркода с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Литература

1. Кривина Е.С., Темралеева А.Д. Морфологический и молекулярно-генетический анализ штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы» // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2022. Т. 77. № 3. С. 160–165.
2. Adar O., Kaplan-Levy R.N., Banet G. High temperature Chlorellaceae (Chlorophyta) strains from the Syrian-African Rift Valley: the effect of salinity and temperature on growth, morphology and sporulation mode // Eur. J. Phycol. 2016. Vol. 51. N. 4. P. 387–400.
3. Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in Chlorella-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biology. 2010. Vol. 12. P. 545–553.

Устойчивость микобиоты пустынных почв к воздействию высоких доз ионизирующего излучения (γ -лучи и ускоренные электроны)

Крючкова М.О.^{1,2}

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва,
margo_kruchkova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38281

Микобиота пустынных почв подвергается серьезному воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как длительное иссушение, повышенные по сравнению с умеренными широтами дозы солнечной радиации, засоление, низкое содержание органического вещества. Для выживания в таких экстремальных условиях грибы выработали адаптационные механизмы к множественному действию стрессоров. Именно поэтому эти эукариотические организмы представляет особый интерес для астробиологов и выбраны в качестве модельных объектов в данном исследовании. Предполагается, что грибы пустынных местообитаний могут выдерживать и более суровые условия, такие как низкое давление, температура, высокие дозы облучения, в том числе и ионизирующего, которые широко представлены в космическом пространстве и на поверхности планет, имеющих весьма разреженную атмосферу, например, на Марсе.

Цель данного исследования – оценить реакцию почвообитающей микобиоты (на примере пустынных почв) на физические воздействия, моделирующие длительное нахождение в инопланетных условиях.

Объектами исследования были образцы верхних гумусовых горизонтов пустынных почв: серозема (Aridic Calcisols, пустыня Негев, Израиль) и серо-коричневой (Xerosols, горная пустыня Марокко).

В работе изучалось воздействие двух типов облучения, встречающихся в космическом пространстве, в частности, на поверхности Марса: γ и ускоренные электроны. Облучение проводили в специальной климатической камере, позволяющей сохранять заданное давление и температуру в течение всего эксперимента, на базе Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе (Санкт-Петербург) (Pavlov et al., 2010). Облучение γ -лучами проводили в режиме низких температур ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) и давления (1 торр). Образец серозема получил суммарную дозу 0,1 МГр, а образец серо-коричневой почвы – 1 МГр.

Облучение ускоренными электронами проводили в режиме низких температур ($-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) и давления ($8-9 \cdot 10^{-3}$ торр) на образцах серозема. Почвенные образцы получили следующие дозы: 0,05; 1; 2; 3; 4 и 5 МГр. Один образец был подвержен воздействию только температуры и давления, без облучения, другой облучали при комнатной температуре и давлении 1 атм (760 торр) дозой в 0,05 МГр.

Далее проводили сравнительный анализ состава сообществ культивируемых микроскопических грибов и разнообразия грибных структур (споры и мицелий) в составе грибной биомассы в облученных и исходных образцах почв.

Для выделения грибов использовали метод посева почвенных суспензий на твердые питательные среды – Чапека и щелочной агар. Содержание биомассы грибов и ее биоморфологическую структуру оценивали методом прямой люминесцентной микроскопии при окрашивании калькофлюором белым и акридином оранжевым. Идентификацию штаммов проводили по культурально-морфологическим признакам и молекулярным методом.

Облучение серозема γ -лучами дозой в 0,1 МГр оказало активирующее воздействие на микобиоту: отмечено возрастание на два порядка численности грибных колониеобразующих единиц (КОЕ), увеличение в 1,5 раза выделяемого видового разнообразия грибов, возрастание содержания биомассы грибных спор и мицелия.

Облучение горной почвы γ -лучами более высокой дозы в 1 МГр привело к уменьшению содержания грибной биомассы, к сокращению разнообразия грибных сообществ, подавлению роста многих видов.

Облучение серозёма ускоренными электронами также привело к изменению численности КОЕ, видового разнообразия и структуры грибных сообществ. Численность грибных пропагул увеличилась после воздействия дозами в 0,05 и 1 МГр и уменьшилась после облучения дозами в 3, 4 и 5 МГр. Видовое разнообразие постепенно снижалось по мере увеличения дозы облучения ускоренными электронами. После воздействия дозой в 1 и 2 МГр выделяли много дрожжей. Наиболее устойчивыми к высоким дозам облучения ускоренными электронами были представители мелкоспоровых видов, при этом они были редки или вовсе не выделялись из контрольного образца.

Облучение ускоренными электронами дозой в 0,05 МГр при комнатных температуре и давлении 1 атм (760 торр) имело наибольший стерилизующий эффект, который проявлялся в значительном сокращении численности КОЕ и числа видов. Так, при низких температуре и давлении стресс от облучения электронами оказался даже не столь существенен, чем облучение даже в минимальной дозе, но при температуре и давлении, свойственным условиям Земли.

В результате данного исследования было показано, что при воздействии крайне высоких доз ионизирующего излучения (γ -лучи и ускоренные электроны) при низких температуре и давлении, моделирующих длительное нахождение в инопланетных условиях, жизнеспособность почвенных грибных сообществ, сформировавшихся в экстремальных условиях Земных пустынных почв, сохраняется.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

Литература

1. Pavlov A.K., Shelegedin V.N., Vdovina M.A. et al. Growth of microorganisms in Marian-like shallow subsurface conditions: laboratory modeling // International Journal of Astrobiology. 2010. V. 9. № 1. P. 51–58.

Таксономическая идентификация прокариот хемоклина меромиктического озера Светлое и оценка влияния пробоподготовки на состав микробных сообществ

Ловдина Т.И.^{1,2}, Червошкина А.С.², Аксенов А.С.^{1,2}, Воробьева Т.Я.¹, Забелина С.А.¹

¹ ФИЦ комплексного изучения Арктики им. Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск

² Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, tanya.lovkina@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38282

Микробные сообщества хемоклина являются потенциально важным компонентом меромиктических озер. Водоемы с выраженным меромиксисом – химически и/или термально стратифицированы в течение нескольких лет и имеют специфические экологические особенности. Хемоклин – слой водоема, образованный между верхним слоем миксолимнионом и нижним – монимолимнионом. Он характеризуется наличием сложных бактериальных сообществ, автотрофных и гетеротрофных прототистов и метазоопланктона, высокими темпами кислородного и аноксигенного фотосинтеза и некоторыми биогеохимическими процессами [1].

Озеро Светлое в Архангельской области (бассейн Белого моря) относится к редкому типу пресных железомарганцевых меромиктических водоемов и является современным аналогом раннепротерозойских водоемов [2]. Несмотря на ранее проведенные исследования прокариотического разнообразия озера [3], важным является оценка современного состава микробных сообществ и мониторинг. С развитием методов выделения тотальной ДНК и технологий секвенирования актуальным являются методические аспекты, в том числе способы концентрирования микроорганизмов водных объектов.

Целью работы является получение таксономического разнообразия бактерий и архей хемоклина озера Светлое в рамках мониторинга с учетом влияния методов пробоподготовки образцов.

Для изучения состава сообществ прокариот водоема исследователи выделяют тотальную ДНК непосредственно из объема жидкой среды или подвергают пробу концентрированию микробных клеток путем центрифугирования или фильтрацией через мембранный или объемный фильтр [4]. В работе использовали фильтрационный и седиментационный методы.

Отбор проб осуществляли в апреле 2018 года и прокариоты хемоклина (22,5 м) концентрировали в момент отбора на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах с размером пор 0,22 мкм и диаметром 47 мм (GSWP 4700, Millipore) с помощью поликарбонатных вакуумных фильтрационных (Sartorius, Германия). Установки предварительно стерилизовали в автоклаве при 121 °С и давлении 0,5 бар 30 минут. Максимально профильтрованный объем пробы хемоклина составил 250 мл. Фильтры с сконцентрированными на них клетками помещали в стерильные пробирки для криозаморозки и замораживали в жидком азоте. Для концентрирования прокариот центрифугированием 50 мл пробы воды с глубины 22,5 м распределили в стерильные пробирки на 1,5 мл и заморозили во льду. В дальнейшем в лабораторных условиях, ориентировочно через 6 часов после отбора пробы, микробные клетки осаждали на центрифуге Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия) при 14 000 об/мин и температуре 4 °С в течение 30 минут. Выделение тотальной ДНК осуществляли буферным раствором СТАВ (2%) и смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1), секвенирование амплифицированных участков гена 16S рРНК проводили на платформе MiSeq (Illumina, США, 2016) в ВНИИСХМ (г. Пушкин).

Различие в полученных результатах заметно уже при анализе числа прочтений секвенируемых участков гена 16S рРНК: для фильтрованной пробы он составило 21973, для седиментационных образцов в 2 раза выше – 52142. При оценке альфа-разнообразия индекс Шеннона выше для пробы с фильтрацией, он составил 4,298, для осажденных на центрифуге проб – 3,798. Индекс Chao1, показывающий реальное количество таксонов, составил 430 для фильтрационных образцов, 620 – для седиментационных, данный факт свидетельствует о высоком видовом разнообразии микробиоты исследуемых проб. Анализ бета-разнообразия показал, что микробиомные сообщества исследуемых бактерий и архей образцов хемоклина очень сильно отличаются по имеющимся филумам, индекс Routledge составил 0,075121. Различия в идентифицируемых порядках бактерий приведены на рисунке.

В состав сообществ пробы, подверженной центрифугированию, не вошли археи *Methanomicrobiales* и бактерий *Campylobacteriales*. Во многих случаях процентное содержание расшифрованных участков гена 16S рРНК выше в 1,2 – 1,6 раза при выделении тотальной ДНК из клеток седиментационных проб (порядки *Frankiales*, *unclassified_Actinobacteria*, *Desulfobacterales*, *Burkholderiales*, *Chromatiales*, *unclassified_Gammaproteobacteria*). Например, содержание порядка *Synechococcales* в 1,4 раза выше, чем в культурах фильтра. Именно благодаря высокой численности этих фикоэритринсодержащих цианобактерий, воды хемоклина окрашены в розоватый цвет. Содержание бактерий порядка *Methylococcales* выше при центрифугировании практически в 2 раза. Однако порядки *Bacteroidales*, *Chitinophagales* имеют примерно в 2 раза больше считываний гена 16S рРНК при фильтрации воды в сравнении с седиментационными пробами. Идентичная ситуация и с порядком *Verrucomicrobiales*. Разница между результатами секвенирования участков гена 16S рРНК проб фильтрацией и центрифугированием составила 4,2%.

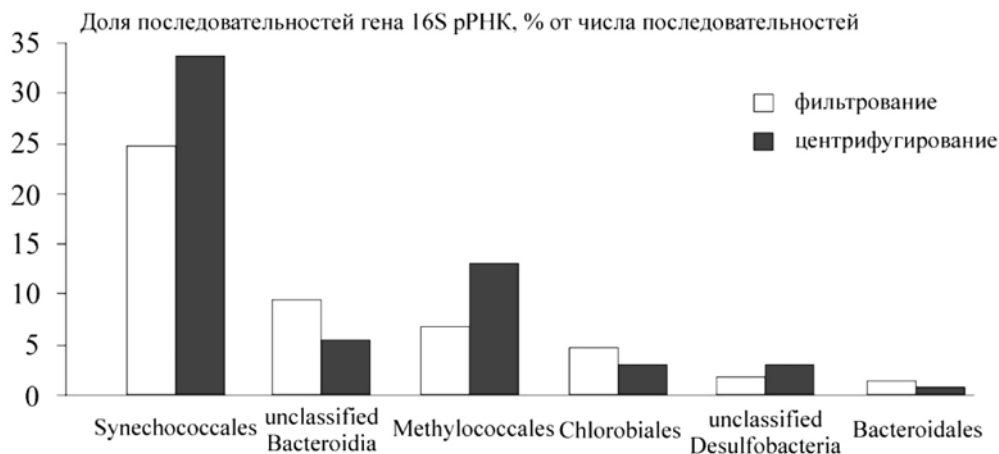


Рис. Таксономическое разнообразие прокариот озера Светлое на уровне порядка

В результате работы мы получили таксономический состав сообществ прокариот хемоклина озера Светлое, обладающих высоким разнообразием. Установлено различие полученных результатах в зависимости от метода концентрирования микробных сообществ хемоклина.

Работа выполнена в рамках ФНИР № 122011800149-3 «Комплексные исследования биотических и абиотических компонентов водных экосистем Субарктики и Арктики в условиях изменяющейся природной среды» и частично за счет РНФ № 22-27-00828 «Оценка эмиссии углерода (CH₄+CO₂) с поверхности внутренних водоемов Европейского Севера России».

Литература

1. Gulati R.D. Ecology of meromictic lakes / R.D. Gulati, E.S. Zadereev, A.G. Degermendzhi [et al.] // Berlin: Springer. – 2017. – Т. 228.
2. Чупаков А.В. Гидрохимические особенности пресноводного меромиктического оз. Светлое (Архангельская область) / А.В. Чупаков, О.С. Покровский, Л.С. Широкова [и др.] // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Естественные науки. – 2013. – № 1. – С. 20–31.
3. Kallistova A. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake / A. Kallistova, I. Rusanov, A. Savvichev [et al.] // Aquatic Microbial Ecology. – 2019. – Vol. 82. – No 1. – P. 1–18.
4. Sovova K. Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)-based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples / K. Sovova, H. Mlejnkova, P. Mlejnek // Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research. – 2008. – Iss. 58. – P. 995–999.

Характеристика микробного сообщества с поверхности образцов органического остекления с многослойным покрытием

Миронская Е.А., Фуфыгина Е.С., Яковлева Г.Ю.

Казанский (Приволжский) Федеральный университет,
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, г. Казань,
katya.mironskaya@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38283

Различные органические стекломатериалы, а именно поликарбонат и полиметилметакрилат, используются для остекления транспортных средств, зданий и сооружений. Для защиты этих материалов от агрессивных внешних факторов, приводящих к истиранию и снижению прозрачности, одним из известных способов является нанесение полисилоксановых покрытий [1]. Однако воздействие внешних факторов в процессе эксплуатации таких покрытий может привести к снижению их механических характеристик, в частности, износостойкости, адгезии к подложке и твердости. Вследствие этого, на поверхности органических стекол появляются повреждения, которые приводят к существенному снижению оптических характеристик. Деструктивное воздействие микроорганизмов является одним из основных факторов, приводящих к снижению механических характеристик полисилоксанов. Следует отметить, что наиболее остро проблема биодеградации полисилоксанов проявляется в условиях тропического климата. Это обусловлено не только большим разнообразием микроорганизмов, способных вызывать биодеструкцию, но и совокупностью агрессивных факторов, таких как высокая влажность, большое содержание солей в воздухе, повышенная интенсивность УФ воздействия [2].

Целью данной работы является характеристика микробного сообщества, выделенного с поверхности образцов композиционного органического остекления с многослойным покрытием.

Исследуемые образцы композиционного органического остекления размером 50×50 мм выдерживались в течение 12 месяцев на микологических стендах на базе Российско-Вьетнамского Тропического

научно-исследовательского и технологического центра (Вьетнам). Выделение микроорганизмов осуществляли с помощью смывов и дальнейшего посева на агаризованные питательные среды: 1) L-агар (для выделения бактерий); 2) среда Чапека-Докса (для выделения микроскопических грибов). Идентификация выделенных бактерий проводилась при помощи метода прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии. Первичная идентификация микромицетов была проведена на основании их морфолого-культуральных свойств. Доминирующие грибы были секвенированы по методу Сэнгера с использованием стандартных праймеров ITS1 и ITS 4.

Всего с поверхности образцов композиций органического остекления с многослойным покрытием было выделено 40 изолятов бактерий. Из 34 идентифицированных бактерий 47% принадлежали к роду *Bacillus*, 15% – к роду *Staphylococcus*, 12% – к роду *Acinetobacter*, 7% – к роду *Lysinibacillus*, оставшиеся 19% представлены единичными видами родов *Rothia*, *Paenibacillus*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus* и *Cutibacterium*. *B. subtilis*, *B. megaterium* и *B. cereus* являлись наиболее частыми представителями рода *Bacillus*.

Из всех выделенных микроскопических грибов 81% принадлежал к родам *Aspergillus* и *Penicillium*, 9% – к роду *Fusarium* и 8% – к роду *Alternaria*. По культурально-морфологическим признакам один из доминирующих микромицетов был отнесен к виду *Aspergillus niger*. С помощью секвенс-анализа определили 3 доминирующих вида: *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum* и *Aspergillus puulaauensis*.

Известно, что бактерии рода *Bacillus* играют значительную роль в процессе биоповреждений. Они способны повреждать различного рода полимеры: полиэтилен, полипропилен, полистирол, поливинилхлорид и полиуретан. Среди соединений, продуцируемых бактериями рода *Bacillus* важными для контроля биодеструкции являются липопептиды, биосурфактанты, поли- γ -глутаминовая кислота и сидерофоры, которые способны модифицировать гидрофобность поверхностей материала, тем самым влияя на адгезию бактериальных клеток, что отражается на образовании биопленки [3]. Кроме бактерий рода *Bacillus*, в биоповреждении различных материалов принимают участие представители родов *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Salmonella* и т.д. [4]. Среди микроскопических грибов представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к наиболее агрессивным биодеструкторам. Наряду с механическими биоповреждениями они являются продуцентами органических кислот, среди которых отмечен высокий уровень щавелевой и лимонной кислот [5].

Следовательно, можно предположить, что выделенное с поверхности образцов композиционного органического остекления с многослойным покрытием микробное сообщество может привести к снижению механических характеристик полисилоксанов при создании благоприятных для прорастания спор условий.

Литература

1. Плакунов В.К. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты / В.К. Плакунов, А.В. Ганнесен, С.В. Мартянов, М.В. Журина // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 6. – С. 631–645.
2. Kartashova V.V. A study of the resistance of polymer coatings for the working equipment of road machinery to the effect of climatic factors / V.V. Kartashova, N.I. Baurova // Polymer Science, Series D. – 2020. – V. 13.(2). – P. 214–218.
3. Tkachuk N. The impact of the bacteria of the genus *Bacillus* on the biodamage; biodegradation of some metals and extensively used petroleum-based plastics / N. Tkachuk, L. Zelena // Corros. Mater. Degrad. – 2021. – V. 2(4). – P. 531–553.
4. Rościszewski P. Biodegradation of polyorganosiloxanes / P. Rościszewski, J. Łukasiak, A. Dorosz, J. Galiński, M. Szponar // In macromolecular symposia. – 1998. – V. 130.(1). – P. 337–346.
5. Yakovleva G. Metabolic activity of micromycetes affecting urban concrete constructions / G. Yakovleva, E. Sagadeev, V. Stroganov, O. Kozlova, R. Okunev, O. Ilinskaya // The Scientific World Journal. – 2018. – V. 2018. – 9 pages.

Выделение фосфатмобилизирующих бактерий из почвы

Мокрушина С.Э.

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»,
Институт биологии и биотехнологии, г. Киров,
sveta.flouni@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38284

Фосфор, являющийся вторым по значимости неорганическим элементом питания растений, также является одним из наименее доступных питательных веществ из-за его нахождения в почве в связанном состоянии. Огромное количество гектаров почв во всем мире содержат недостаточное количество доступного для растений фосфора. Использование бактериальных удобрений на основе фосфатмобилизирующих бактерий может повысить доступность труднорастворимых фосфатов почвы для растений [1, 2].

Целью данной работы является выделение фосфатмобилизирующих бактерий из двух образцов дерново-подзолистой почвы (№ 1 – почва, в которую вносились фосфатные удобрения и № 3 – почва без удобрений).

В ходе работы из навесок почвы, массой 1,0 г № 1 и № 3 без прогревания и прогретых при температуре 100 °С 1 час (1т и 3т) готовили почвенные суспензии растиранием в ступке со стерильной водой. Далее готовили последовательные десятикратные разведения каждого образца до 10⁻⁴. Посев выполняли на агаризованную среду Пиковской поверхностным чашечным методом из разведений 10⁻³ и 10⁻⁴ в трехкратной повторности для каждого образца. Инкубацию посевов производили при температуре 28 °С в течение 4 суток.

В каждом разведении каждого образца считали общую численность КОЕ и среднее на 1 г почвы ± стандартное отклонение (табл. 1).

Таблица 1

Учет результатов на среде Пиковской

Показатель	Номер образца и разведение							
	1 ⁻³	1 ⁻⁴	3 ⁻³	3 ⁻⁴	1т ⁻³	1т ⁻⁴	3т ⁻³	3т ⁻⁴
Количество колоний	69	15	106	18	21	7	140	12
	77	16	98	12	22	5	144	19
	61	5	85	12	30	6	127	28
Среднее значение	69	12	96,3	14	24,3	6	137	19,6
Общая численность, тыс. КОЕ/г	690	1200	693	1400	243	600	1370	1966
Общая численность ± стандартное отклонение, тыс. КОЕ/г	609±80	1200±608	963±105	1400±346	243±49,3	600±100	1370±88	1966±802

После подсчета общей численности колоний сделали выводы: на чашках с разведениями из образца почвы № 3 общая численность микроорганизмов оказалась выше, чем из образца № 1; после прогревания образцов численность микроорганизмов существенно не снизилась, но изменился качественный состав.

Фосфатмобилизирующие микроорганизмы на чашках со средой Пиковской выявили по наличию зон просветления вокруг колоний (рис. 1). Обнаружили 5 колоний бактерий и 2 колонии мицелиальных грибов.

Для выделения в чистую культуру колонии отсе-
яли на среду МПА секторами (бактерии) и уколом в
центр чашки (грибы). Пересев чистых культур бак-
терий и грибов производили на косо́й агар в про-
бирки со средами RHM и Чапека соответственно.
Культуры вырастили в термостате при 28 °С – 4 су-
ток. Далее сохраняли пробирки с культурами в хо-
лодильнике.

Выделенные чистые культуры фосфатмобилизу-
ющих бактерий будут использоваться для дальней-
ших исследований их свойств. Штаммы бактерий,
которые способствуют превращению труднораство-
римых фосфатов в соединения, усвояемые растени-
ями, могут быть использованы для создания биопре-
паратов.



Рис. 1. Зона просветления вокруг бактериальной колонии

Литература

1. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Генетический контроль признаков, связанных с усвоением фосфора у сортов риса (*Oryza sativa* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(2):197–204.
2. Выделение и характеристика почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов / Белясова Н.А., Игнатовец О.С., Сергиевич Д.С., Минаковский А.Ф., Босак В.Н., Сачивко Т.В. Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. № 2. С. 93–97.

Биотехнологический потенциал заквасочной микрофлоры национального лезгинского напитка тач

Никитина А.В., Харина Е.И.

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
(Медико-биологический факультет, базовая кафедра микробиологии),
annanikitina326325@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38285

На Северном Кавказе издавна готовят национальные продукты, которые нашли применение как сре-
ди народа, так и в пищевой промышленности. Эти продукты пользуются большим спросом, так как со-
четают в себе отличные вкусовые качества и сбалансированный комплекс микроорганизмов [1]. Изго-
товление национальных напитков на молочной основе уходит в глубокую древность. В состав заквасок
входят не только молочнокислые бактерии, но и дрожжевые культуры. Кроме того, помимо молока раз-
личных животных, закваски могут включать в себя зерновые культуры.

На сегодняшний день актуальным является поиск новых эффективных пробиотиков, антагонистов
патогенной и гнилостной микрофлоры кишечника. Микрофлора желудочно-кишечного тракта – первич-
ный неспецифический иммунный барьер, регулятор метаболических процессов, который образует вто-
ричный поток пищевых и регуляторных веществ благодаря потреблению микроорганизмами веществ,
не перевариваемых полостным пищеварением. Особое внимание сейчас уделяется биопрепаратам, со-
зданным на основе культур молочнокислых микроорганизмов, оказывающие благотворное влияние на
организм человека. Основой таких биопрепаратов зачастую становятся национальные напитки, состав
которых до сих пор не изучен полностью [4, 5]. В Дагестане очень популярен национальный лезгин-
ский напиток тач, известный в народе целебными свойствами. Напиток готовят из пророщенного зер-

на, он имеет немного кислый вкус и похож на кисель. Тач обычно готовят в зимнее время, так как считается, что он помогает сохранить тепло и наполняет тело силой [2].

Актуальность исследования связана с изучением биотехнологического потенциала заквасочной микрофлоры национального лезгинского напитка тач. Основной целью данной работы стало выявление биотехнологического потенциала национального лезгинского напитка тач. Объектом исследования явился состав микроорганизмов национального напитка тач. Предмет исследования – свойства представителей микробного консорциума данного напитка.

В любом консорциуме преобладающими микроорганизмами будут представители микробиоты исходного сырья. Соответственно, для напитка тач характерны эпифитные, фитопатогенные и транзиторные микроорганизмы зерна.

Исследования в рамках эксперимента проводились в лаборатории базовой кафедры микробиологии медико-биологического факультета Северо-Кавказского федерального университета. Материалом для исследования послужила закваска национального лезгинского напитка тач. Объектом исследования явились штаммы микроорганизмов, выделенные из закваски.

Для выделения чистых культур и количественного учета заквасочной микрофлоры использовали метод разведений и подсчета числа микроорганизмов. Порядок проведения работы и методика эксперимента основаны на ГОСТ 10444.11-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных».

Во время проведения эксперимента использовались среды МПА, МПЖ, МПБ, МРС, Сабуро, Эндо, ЖСА, среды Гисса. Количество микроорганизмов считали на твердых питательных средах в чашках Петри. Колонии подсчитывали в каждом из параллельных посевов и находили среднее арифметическое значение числа колоний. Результаты подсчета записывали в виде КОЕ/см³ (г). Морфология микроорганизмов изучалась при помощи методов микроскопирования фиксированных препаратов.

На плотных средах учитывали размер колоний, цвет, прозрачность, форму, наличие пигмента, гемолиз вокруг колонии и его характер, способность разжижать желатин и т.д. На жидких средах отмечали их прозрачность, наличие осадка (придонный рост) или пленки на поверхности среды.

Анализ результатов посевов заквасочной культуры из разведений оценивались по каждому образцу, после этого рассчитывалось среднее арифметическое значение. Общее микробное число (ОМЧ) бактерий составило 980 тыс. микробных клеток в 1 грамме закваски. ОМЧ грибов и плесневых дрожжей на среде Сабуро составило 245 тыс. микробных клеток. Из вышесказанного можно сделать вывод, что около 80% из всех обнаруженных микроорганизмов составили бактерии и только 20% – плесневые грибы и дрожжи.

Большая часть микроорганизмов относится к группе молочнокислых бактерий, которые являются грамположительными неподвижными каталозоотрицательными палочками или кокками. На основе изучения культуральных свойств этих микроорганизмов, было выявлено 4 рода: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* и *Pediococcus*. Помимо молочнокислых бактерий, были обнаружены еще 6 видов микроорганизмов, относящихся к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Candida* и *Saccharomyces*.

Учитывая результаты микроскопирования выделенных образцов, видно, что морфология микробного консорциума заквасочных культур напитка тач имеет определенную закономерность. Около половины микрорганомов – молочнокислые микроорганизмы. Встречаются палочковидные и кокковые (моно-, дипло- и тетракокки) формы. Микотические организмы относятся к округлым и овальным морфотипам.

Наличие пробиотических культур в закваске говорит о целебных свойствах напитка тач. Так как это будет благоприятно влиять на микрофлору ЖКТ и на здоровье в целом. Тем не менее, обнаружение микроорганизмов, относящихся к родам *Candida*, *Micrococcus* и *Staphylococcus* приводит к мысли о нормированном употреблении напитка тач, так как это может привести к дисбиозу.

Литература

1. Ганина В.И. Действие пробиотических продуктов на возбудителей кишечных инфекций // Молочная промышленность. 2001. № 11. С. 47–48.
2. Донченко Л.В. Продукты питания в отечественной и зарубежной истории / Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. М.: ДеЛи принт, 2006. 295 с.

3. *Коршунов В.М.* Проблема регуляции микрофлоры кишечника / В.М. Коршунов. М.: Микробиология, 1995. № 3 С. 48–55.
4. *Шалыгина А.М.* Биологическая ценность и антагонистическая активность функционального кисломолочного продукта / А.М. Шалыгина, Н.Ю. Эрвольдер, В.И. Ганина Л.В. Калинина. М.: Молочная промышленность, 2000. № 11. С. 49–84.
5. *Charteris W.P.* Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli / W.P. Charteris [et al.] // J. Food Prot. – 2001. V. 64. P. 2007–20014.

Бактериофаги и бактерии мраморного рака (*Procambarus sp. Ortmann, 1905*)

Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.Е., Сузина Н.Е., Зимин А.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
n.nikulin@ibpm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38286

В последние 30 лет ракообразные стали постоянным источником пищевого белка и целого спектра необходимых человеку микроэлементов и витаминов, во всем мире, в том числе и в России (1). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (2), мировое производство ракообразных в аквакультуре сохранило тенденцию роста в 2020 г. и достигло 11,2 млн т на сумму 81,5 млрд долларов США (2). С экологической точки зрения аквакультура снимает часть промышленного давления на природные биоценозы и позволяет сохранить в природе виды деликатесных ракообразных. Представители отряда Decapoda занимают около 23% мировой аквакультуре (2). В основном в культуру введены более 45 видов Decapoda из них 7 – это пресноводные раки, которые занимают 10% в общем объеме мировой аквакультуре (2). Методы размножения и выращивания ракообразных находятся в постоянной модификации и улучшении. Есть два основных подхода к выращиванию раков. Первый подход – это их разведение в природных или искусственных прудах небольшой глубины. Второй – это аквариумное разведение в установках замкнутого цикла, где создают оптимальные условия для разведения раков. Полный контроль температуры и других условий позволяет разводить тропические виды, обладающие высокой продуктивностью. Это, например, мраморный и австралийский красноклещневый раки, а также другие теплолюбивые виды (3, 4). Эти раки при оптимальных условиях содержания и кормления достигают веса 50 г уже через полгода, а за год могут вырасти до веса в 100 и более грамм (3, 4).

Для получения здорового питания на основе ракообразных, выращиваемых в установках замкнутого цикла, необходима характеристика бактериальной составляющей их микрофлоры, которую рационально характеризовать вместе с исследованием содержания бактериофагов. Одним из перспективных подходов контроля развития бактерий в аквакультуре ракообразных является обработка бактериофагами (5).

Из желудка рака отряда Decapoda было выделено 11 штаммов бактерий различного таксономического положения. Бактерии выделялись из суспензии содержимого желудка на богатых и бедных по составу питательных средах. 0,1 мл образца растирался на агаризованной среде до получения единичных колоний. Чистота клеток в колонии контролировалась дополнительными посевами. Общее количество клеток, выделенных из густой суспензии желудочного содержимого на агаризованных коммерческих средах Brain Heart Infusion (Difco) и 5/5 (ИБФМ РАН) не превышало 10^8 КОЕ/мл, на разбавленных в 5 и 10 раз агаризованных средах 5/5 и Minimal Agar Davis (Difco) составляло 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Популяция выделенных штаммов бактерий (табл. 1) представлена следующей микрофлорой (табл. 1).

**Таксономия ряда штаммов бактерий желудка рака отряда *Decapoda*
по базе данные Bruker Daltonik**

Название штамма бактерий	Результат определения	Значение по БД MALDI Biotyper
Pu-ZDBH14	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.052, 1.576
Pu-ZDBH12	<i>Aeromonas veronii</i>	1.868, 1.843
Pu-ZD1.2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1.938, 1.799
Pu-ZD5.5.4	<i>Citrobacter braakii</i>	2.956, 1876

Также из желудка рака были выделены бактериофаги, путем фильтрования содержимого желудка, разбавленного в 10 мл физ. раствора через шприцевые фильтры с размером пор 0,22 мкм и концентрировании на центрифужных концентраторах при 10 000 об·мин⁻¹ 2 мин. На металлическую сеточку, покрытую формваровой пленкой, наносили концентрат, высушивали его и контрастировали 1% раствором уранилацетата. Производили электронное микрофотографирование.

В результате в основном были найдены вирусы, имеющие морфологию сифовирусов. Найденные сифовирусы имели размеры головок длиной примерно 160 нм и хвосты длиной примерно 430 нм, что позволяет отнести их к гигантским фагам (jumbo phages). Таким образом были опробованы методы выделения бактериофагов из желудка мраморного рака, что открывает перспективу выделения индивидуальных изолятов и поиск бактериофагов для контроля развития бактериального сообщества при нарушениях работы желудочно-кишечного тракта этих ракообразных в аквакультуре. Для таких бактерий как *Aeromonas* и *Shewanella* в основном при выделении из природных образцов также описывают сифовирусы. Вирусы данного морфотипа часто проявляют способность к лизогении, классического типа как у бактериофага λ. С помощью использованных подходов была проведена первичная характеристика бактериально-фагового сообщества желудка мраморного рака.

Литература

1. Лагуткина Л.Ю., Пономарёв С.В. (2018). Органическая аквакультура как перспективное направление развития рыбохозяйственной отрасли (обзор). Сельскохозяйственная биология, 53(2), 326–336. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.15389/agrobology.2018.2.326rus>
2. ФАО. 2020. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры – 2020. Меры по повышению устойчивости. Рим, ФАО. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.4060/ca9229ru>
3. Анкешева Б.М., Тангатарова Р.Р., Пятикопова О.В. (2021). Формирование ремонтно-маточного стада австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*) в индустриальной аквакультуре. Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра), 201(4), 948–959.
4. Пятикопова О.В., Анкешева Б.М., Тангатарова Р.Р., Бедрицкая И.Н. (2022). Гидрохимические условия выращивания австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*) в Астраханской области. Водные биоресурсы и среда обитания, 5(3), 32–47.
5. Kondabagil K., Sicheritz-Pontén T., Clokie M. (2020). in Phocus: A Local Perspective on Phage-Based Biocontrol in Agriculture and Aquaculture in India. PHAGE (New Rochelle, N.Y.), 1(4), 169–173. 10.1089/phage.2020.29010.kko.

Устойчивость к ультрафиолету двух новых бактериофагов бактерий рода *Streptomyces*

Никулина А.Н.¹, Рябова Н.А.², Lu Y.³, Зимин А.А.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
firetiger2011@yandex.ru

² Институт белка РАН, Пушкино, Московской области, Российская Федерация

³ College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38287

Изучение влияния УФ-излучения на различные группы живых объектов дает возможность понять пути эволюции жизни, произошедшие под влиянием солнечного света, так и решить целый ряд актуальных задач в ряде областей медицины и биотехнологии. Особое внимание требует и изучение механизмов влияния УФ на вирусы. УФ-излучение является одним из основных и доступных способов дезинфекции поверхностей, воды, воздуха и других сред обитания вирусов. До настоящего времени накоплено очень мало научных данных касательно влияния УФ-излучения на вирусы бактерий из почвенных экологических ниш. Изучение этого вопроса может оказаться существенным не только в контексте улучшения понимания роли почвенных фагов в глобальных циклах вещества и энергии, но и является актуальным для агротехнологий в сельском хозяйстве. Фаги могут использоваться в сельском хозяйстве в качестве средств тонкого контроля развития бактериального сообщества агробиоценозов, а также как агенты для борьбы с бактериальными инфекциями, не только животных, но и растений. Повышенная инсоляция пагубно влияет на используемые для этих целей бактериофаги, поэтому для практики такой обработки как самих растений, так и их ризосферы важно найти в природе более устойчивые штаммы во всех экологических нишах для создания фаговых коктейлей, эффективных в условиях высокой инсоляции [1].

Было выделено 2 новых бактериофага бактерий *Streptomyces venezuales* из почв в загонах зубров Приокско-террасного биосферного заповедника и почв г. Москвы. Бактерии рода *Streptomyces* достаточно распространены среди дерново-подзолистых почв, в связи с чем можно предположить, что два новых выделенных нами бактериофага могут быть распространенными в данных биотопах. Бактериофаги были очищены, получены в высоком титре, была произведена проверка на поливалентность каждого фага, была выделена ДНК. По данным электронной микроскопии можно предположить, что бактериофаги принадлежат к семейству *Syphoviridae* (ICTV на 2021 г.) и к морфотипу В1 по Брэдли [2].

Очищенные препараты бактериофагов были облучены разными дозами УФ-излучения, с длиной волны $\lambda = 354$ нм и $\lambda = 254$. За время облучения УФ ($\lambda = 254$ нм) в течение 180 секунд численность бактериофага, выделенного из почв заповедника, $3 \cdot 10^3$ упала до 0. Таким образом, для полной инактивации данного бактериофага необходима доза УФ эквивалентная $112,5$ Дж/м². Численность бактериофага, выделенного из почв г. Москва упала с $2 \cdot 10^5$ до 0 за 120 секунд облучения УФ ($\lambda = 254$ нм). Для полной инактивации бактериофага Мб необходима доза УФ эквивалентная 75 Дж/м². Влияния на морфологию бляшек бактериофагов образующихся при коротковолновом облучении замечено не было, также не было замечено изменений в характере зарастания бляшек фагов толерантной культурой. За время облучения УФ ($\lambda = 366$ нм) в течение 30 минут численность бактериофага, выделенного из почв заповедника, снизилась в 2,72 раза. Численность бактериофага, выделенного из почв г. Москвы за 30 минут облучения УФ ($\lambda = 366$ нм) снизилась в 6,75 раз. Таким образом, стрептофаг, выделенный из почв заповедника оказался более резистентным как к коротковолновому, так и к длинноволновому УФ-излучению, чем стрептофаг, выделенный из почв г. Москвы.

В целом, выделенные новые бактериофаги стрептомицет являются более устойчивыми именно к коротковолновому УФ-излучению, чем ряд хорошо изученных бактериофагов *E. coli*, таких как Т-четные бактериофаги, лямбда и т.п. В литературных обзорах обсуждается очень мало опытов по исследо-

ванию воздействия УФ-света на бактериофаги стрептомицет. Также очень мало свидетельств об инактивации ультрафиолетом бактериофагов стрептомицет, относящихся к семейству *Siphoviridae* в связи с чем сложно однозначно сказать, являются ли все бактериофаги стрептомицет более устойчивыми к УФ-излучению, чем, например, бактериофаг T4, инактивация которого происходит при 7–15 Дж/м² [3]. Бактериофаги стрептомицет отличаются большим содержанием ГЦ-пар оснований в составе ДНК, как правило от 60 до 75% [4]. Вероятно, выделенные нами фаги – не исключение из этих правил. Большой процент ГЦ-пар в составе ДНК может давать некое преимущество в выживании фагов стрептомицет после облучения большими дозами ультрафиолета. Выделенные нами бактериофаги не имеют существенной разницы в морфологии и размерах капсида. Вероятно, причина устойчивости фага, выделенного из почв заповедника, кроется в особенностях работы систем репарации клетки-хозяина, либо, самого фага. Планируемое в дальнейшей работе секвенирование ДНК новых фагов позволит уточнить эти предположения. Многие бактериофаги семейства *Syphoviridae* (ICTV на 2021 г.) морфотипа В1 обладают способностью к трансдукции. Классическим примером является бактериофаг лямбда, осуществляющий специализированную трансдукцию хромосомных генов бактерий [5].

В дальнейшем планируется исследовать способность к осуществлению горизонтального переноса генов новыми выделенными нами из почвы актинофагами и попытаться использовать их для моделирования фаговой трансдукции в природных условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669>.

Литература

1. *Iriarte F.B. et al.* “Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces.” *Applied and environmental microbiology* vol. 73,6 (2007): 1704–11. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1128/AEM.02118-06
2. *Bradley D.E.* “Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.” *Bacteriological reviews* vol. 31,4 (1967): 230–314. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1128/br.31.4.230-314.1967
3. *Kowalski W.* A Genomic Model for the Prediction of Ultraviolet Inactivation Rate Constants for RNA and DNA Viruses. *IUVA News*, 2009
4. *Montaño Elizabeth T. et al.* “Isolation and characterization of Streptomyces bacteriophages and Streptomyces strains encoding biosynthetic arsenals.” *PloS one* vol. 17,1 e0262354. 21 Jan. 2022, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1371/journal.pone.0262354
5. *Fraser D.K.* Properties and origin of the transducing particles in low frequency transduction by bacteriophage lambda. *Virology*. 1962 Jul;17:397–410. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/0042-6822(62)90135-6. PMID: 13894747.

Бактериофаг *Keboquartus* образует плазмидный профаг в штамме *Bacillus mycoides* КВАВ4

Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
e.pilgrimova@ibp.msu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38288

Вирусы бактерий, или бактериофаги, демонстрируют различные стратегии развития в бактериальной клетке-хозяине, основные из которых включают литический и лизогенный жизненный циклы. Вирулентные (или облигатно литические) бактериофаги производят сборку дочерних вирусных частиц практически сразу после попадания в хозяйскую клетку. За сборкой следует разрушение клеточной стен-

ки изнутри и выход новосинтезированных вирусных частиц в окружающую среду (литический цикл). Другой тип стратегии развития – лизогенный жизненный цикл, характерный для умеренных бактериофагов – подразумевает присутствие генетического материала бактериофага в хозяйской клетке неопределенно долгое время в неактивном состоянии (состояние профага), когда при делении клетки-хозяина геном профага, аналогично бактериальному, копируется репликационным аппаратом клетки с последующим равномерным распределением копий между дочерними клетками.

Профаги могут поддерживаться в хозяйской клетке в интегрированном состоянии (когда происходит встраивание профага в хромосому или плазмиду хозяина) или автономно – в состоянии эписомы (линейной или циркулярной плазмиды). Профаги могут сохраняться в популяции хозяина длительное время, а затем переключаться на литический цикл (индукция профагов). Биологически активные профаги (индуцибельные и способные продуцировать функциональные фаговые частицы) могут мутировать в неактивные формы, неспособные к воспроизведению.

Известно более 20 бактериофагов, для которых было экспериментально подтверждено формирование кольцевых плазмидных профагов в цитоплазме клетки-хозяина. В одной из наших предыдущих работ мы провели поиск последовательностей предполагаемых циркулярных плазмидных профагов в геномах *Bacillus cereus sensu lato* с целью отбора штаммов, содержащих такие молекулы, для дальнейшей экспериментальной верификации присутствия профагов. По результатам анализа, одним из штаммов, предположительно содержащим плазмидный профаг, оказался штамм *Bacillus weihenstephanensis* КВАВ4. Предполагаемый профаг был ранее отсеквенирован и загружен в GenBank под названием plasmid pWB403 (CP000906.1), длина его генома составляет 64,977 п.н.

В данной работе мы ставим целью подтвердить существование данного профага в циркулярной плазмидной форме в цитоплазме штамма *Bacillus weihenstephanensis* КВАВ4, и, предположительно, идентичного штамму *Bacillus mycoides* КВАВ4 (номер доступа GenBank: NZ_CP035997.1. Тотальная ДНК штамма КВАВ4 была отсеквенирована на платформе Illumina с покрытием 440x, с последующей сборкой генома с помощью Unicycler v0.4.8. В результате сборки было получено 49 контигов (N50 = 608334), два из которых обладали циркулярной топологией. Последовательность одного из циркулярных контигов оказалась на 100% идентична сиквенсу предполагаемого циркулярного плазмидного профага plasmid pWB403 (CP000906.1).

Чтобы проверить, действительно ли данная плаزمида является активным плазмидным профагом, штамм VKM КВАВ4 использовался в эксперименте по индукции профагов митомицином С. Культуру штамма растили при температуре 30 °С до достижения оптической плотности 0.3 при длине волны 595 нм. Затем добавляли в среду митомицин С до конечной концентрации 0.2 мкг/мл и продолжали инкубацию еще 3–4 часа до снижения оптической плотности, обусловленного почти полным лизисом культуры. Культуральную жидкость центрифугировали и супернатант титровали методом двуслойного агара с десятикратными разведениями, чтобы выявить присутствие бактериофагов. Негативные колонии бактериофагов обнаруживались в пятом разведении среды с митомицином С и не обнаруживались в контроле (среде без добавления митомицина), при этом, по результатам спот-теста, штамм-хозяин был устойчив к митомицину в рабочей концентрации (0.2 мкг/мл), что подтверждает успешную индукцию профагов при добавлении антибиотика.

Геном профага был аннотирован и было предсказано 89 белок-кодирующих генов, включая гены системы сегрегации плазмид, обеспечивающие репликацию профага в состоянии плазмиды. Профаг был назван Kebaboquartus – производное от названия хозяйского штамма КВАВ4. BLASTN анализ показал, что Kebaboquartus не имеет близких родственников из числа известных вирусов – идентичность с геномом наиболее родственного бактериофага, *Bacillus phage vB_BauS_KLEB27-1*, составила менее 1%. Таким образом, Kebaboquartus является представителем нового высокорангового вирусного таксона – рода или семейства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Метаболический потенциал бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из подземных вод с нитратным и радионуклидным загрязнением

Попова Н.М.¹, Баринаева А.В.², Сафонов А.В.¹, Бабич Т.Л.³

¹ Институт физической химии и электрохимии РАН им. А.Н. Фрумкина,
nmpopova.ipse@mail.ru

² Московский педагогический государственный университет

³ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38289

Важную роль при загрязнении подземных вод радионуклидами играют предприятия добычи и переработки урановой руды, подземные и приповерхностные хранилища РАО, опытные испытания. Радиоактивное загрязнение может сопровождаться сопутствующими анионными соединениями (нитратами, сульфатами и др.), а также тяжелыми металлами. Подобные комплексные загрязнения являются чрезвычайно сложной проблемой, поскольку высокий нитратно-сульфатный фон значительно увеличивает растворимость наиболее долгоживущих радионуклидов (актининов и технеция), что приводит к их миграции на значительные расстояния. Единственным недорогим и просто реализуемым методом очистки подземных вод является *in situ* биоремедиация. Высокий уровень токсического стресса в загрязнённых участках часто приводит к снижению разнообразия аборигенных микробных сообществ, в связи с чем больший интерес представляет реинтродукция наиболее приспособленных его представителей.

В данном исследовании были изучены штаммы представителей рода *Pseudomonas*, выделенные из экстремальных мест обитания. Штамм *Ps. (Stutzerimonas) xanthomarina* NP2-1570 был выделен из сверхглубоких высокоминерализованных подземных вод (глубина 1570 м) хранилища жидких радиоактивных отходов НИИАР (Димитровград). Штаммы *P. veronii* А-6-5 и SHC-8-1 были выделены из подземных вод вблизи хранилища жидких РАО Б-2 АО «Сибирский химический комбинат» (12–15 м), *P. putida* С-49-2 также была выделена на территории АО «Сибирский химический комбинат» (370 м).

Все изученные штаммы *Pseudomonas* были способны к образованию биопленок, защищающих клетки от токсического воздействия. На основании данных полногеномного секвенирования штаммов были обнаружены гены *NarG*, *NirS*, *NorB*, *NosZ*, участвующие в процессе денитрификации, гены деградации ксенобиотиков и гербицидов, устойчивости к тяжелым металлам (цинку, меди, хрому и др.). В лабораторных экспериментах была установлена способность восстанавливать ионы уранила и пертехнетата, переводя их в малорастворимые формы. Таким образом, изученные штаммы могут быть использованы в качестве интродуцированных путём инъекции в загрязнённые участки водоносных горизонтов вместе с растворимыми органическими соединениями.

Нитрификация в техногенно-преобразованных почвах шламонакопителя озера Атаманского (Ростовская область)

Пуликова Е. П., Горовцов А.В., Литвинов Ю.А., Минкина Т.М.

Южный федеральный университет,
Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону,
epulikova@sfnedu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38290

Загрязнение почв тяжёлыми металлами (ТМ) приводит к изменению микробного сообщества и активности процессов, за которые ответственны. Действие ТМ на процессы цикла азота разнообразно и

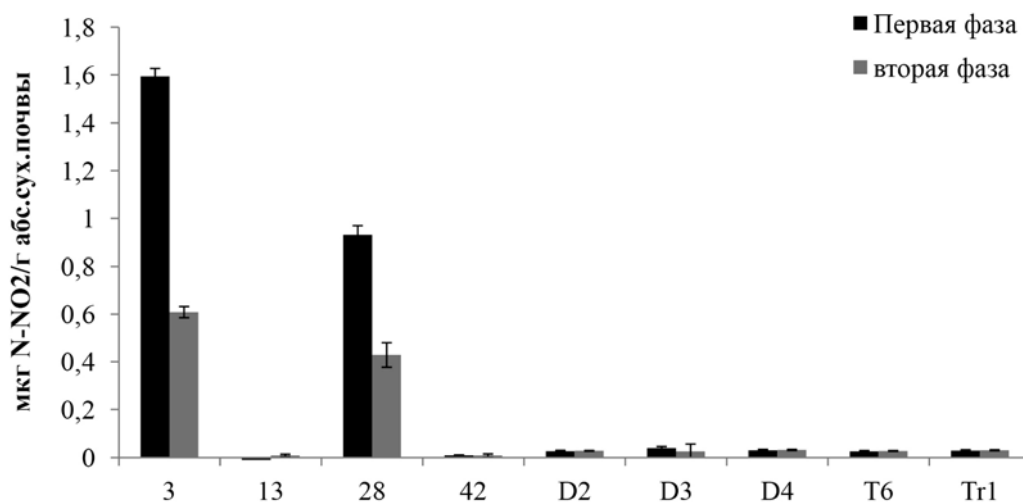


Рис. 1. Активность нитрификации почв озера Атаманское. 3 – незагрязнённая почва, контрольный участок

неоднозначно. Высокие концентрации поллютантов могут как снижать активность отдельных процессов трансформации азота, так и увеличивать ее или же не оказывать выраженного влияния. Процессы нитрификации особенно чувствительны к ТМ, поэтому этот показатель используется для экологического мониторинга загрязнённых почв [1, 2]. Кроме того, нарушение процессов нитрификации может привести к нарушению всего цикла азота и минерального питания растений. Однако, воздействие ТМ на нитрификацию в почвах с длительным загрязнением до сих пор остается слабо изученным, поэтому целью нашего исследования стало изучение этого процесса в техногенно-преобразованных почвах, подвергающихся загрязнению более чем 50 лет.

Объектами исследования являются техногенно-преобразованные почвы (Spolic Technosols), расположенные на территории бывшего Атаманского озера в пойме Северского Донца Каменск-Шахтинского района Ростовской области. С 1960-х до середины 1990-х годов озеро Атаманское использовалось как накопитель стоков химических предприятий [3]. Исследуемые техноземы имеют крайне опасный уровень загрязнения ТМ [3].

Активность окисления аммония и нитрита была определена посредством инкубации почвенных образцов с добавлением сульфата аммония в присутствии хлората (ингибитор второй фазы нитрификации) [4] с последующим добавлением реактива Грисса и фотоколориметрией при 540 нм. Концентрации нитрита в почве определялись в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2.2:3.51-08.

На рис. 1 показано, что наибольшая активность окисления аммония и нитрита наблюдалась в почве образца № 3 (1,6 и 0,61 мкг N-NO₂/г абс.сух.почвы, соответственно). Данный образец относится к незагрязнённым почвам, прилегающим к почвам озера Атаманского. Также высокая активность обоих процессов нитрификации наблюдалась в почвенном образце № 28 (0,93 и 0,43 мкг N-NO₂/г абс.сух.почвы, соответственно). В остальных образцах техноземов была зафиксирована крайне низкая активность нитрификации, более чем в 40 раз ниже относительно почвы контрольного участка.

Ранее в других микробиологических исследованиях почв озера было показано, что микробные сообщества продемонстрировали высокий уровень приспособляемости к возникшим условиям [5]. Однако, несмотря на длительность воздействия негативных факторов на почвы озера, активность сообщества нитрификаторов так и не смогла восстановиться до первоначального уровня.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-112.

Литература

1. Liang C.N., Tabatabai M.A. Effects of trace elements on nitrification in soils. – American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1978. – V. 7. – № 2. – P. 291–293.

2. El-Ghamry A.M., Subhani A., Moh'd W., Changyong H., Zhengmiao X. Effects of copper toxicity on soil microbial biomass //Pak. J. Biol. Sci. – 2000. – V. 3. – P. 907–910.
3. Бауэр Т.В., Линник В.Г., Минкина Т.М., Манджиева С.С., Невидомская Д.Г. Эколого-геохимические исследования техногенных почв в пойменных ландшафтах Северского Донца (бассейн Нижнего Дона) // Геохимия. – 2018. – № 10. – С. 956–966.
4. Sauvé S., Dumestre A., McBride M., Gillett J.W., Berthelin J., Hendershot W. Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb or Cu // Applied Soil Ecology. – 1999. – V. 12. – No 1. – P. 29–39.
5. Gorovtsov A., Demin K., Sushkova S., Minkina T., Grigoryeva T., Dudnikova T., Kocharovskaya Y. The effect of combined pollution by PAHs and heavy metals on the topsoil microbial communities of Spolic Technosols of the lake Atamanskoe, Southern Russia //Environmental Geochemistry and Health. – 2022. – V. 44. – № 4. – P. 1299–1315.

Проблемы классификации морфологически сходных осцилляториевых цианобактерий на примере родов *Leptolyngbya*, *Muxacoris* и *Pseudophormidium*

Рабочая Д.Е., Величко Н.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,
st069414@student.spbu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38291

Почвенные органогенные гиполитные горизонты встречаются на небольших свободных ото льда участках Антарктиды, называемых оазисами. Регулярные циклы замораживания-оттаивания, интенсивное УФ-излучение и резкая сезонность в совокупности с сильными ветрами и общим недостатком влаги, позволяют почвенным микроорганизмам выживать на 1–3 см ниже верхнего слоя адгезируясь к частицам мелкозёма. Биоту таких почв в основном составляют гетеротрофные бактерии, микромицеты, микроводоросли и цианобактерии, которые являются первичными продуцентами органического вещества. Биологическое разнообразие цианобактерий в подобных биоценозах представлено в основном нитчатыми осцилляториевыми и ностоковыми цианобактериями (Mergelov et al., 2020).

Методом лабораторного культивирования из образцов почв оазиса Холмы Ларсеманн были получены накопительные культуры антарктических почвенных осцилляториевых цианобактерий. Штаммы выделяли при температуре +22 °С на минеральной среде BG-11 и постоянном освещении лампами дневного света (500 lx). Альгологически чистые культуры поддерживали на 1%-ной агаризованной или жидкой среде BG-11. Форму и линейные параметры клеток определяли с помощью микроскопа Leica DM2500. Данные по линейным размерам клеток статистически обрабатывали. Таксономическая идентификация полученных штаммов проводилась с учетом комплекса их фенотипических признаков, таких как общая форма трихома, линейные размеры клеток, наличие или отсутствие калиптр у концевых клеток, некридий, а также чехлов. Основу полученной рабочей коллекции составили осцилляториевые цианобактерии, которые согласно морфологическому анализу были отнесены к р. *Leptolyngbya*, *Phormidesmis* и *Pseudophormidium*. Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen) согласно протоколу фирмы-производителя. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили праймерами 27F/1492R и 322F/340R. Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали по Сэнгеру. Для уточнения таксономического статуса полученных штаммов был проведен анализ их молекулярно-генетических признаков с использованием данных секвенированных последовательностей гена 16S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров *rrn*-оперона, а также анализ вторичной структуры внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) с помощью RNAstructure (<https://rna.urmc.rochester.edu/>). Для поиска сходных последовательностей использовали GenBank. Филогенетический анализ проводили с использованием метода Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) и Bayesian inference (BI) с помощью MEGA5.0 (Tamura et al., 2011), а также в MrBayes on XSEDE (3.2.7a) и RAxML-NG (1.1.0) сервера CIPRES Science

Gateway v.3.3 (Miller et al., 2010) с применением модели нуклеотидных замен GTR+G+I. Для Байесовского построения (BI) было выполнено 2 независимых прогона с 4 цепочками Марковской цепи Монте-Карло (MCMC) одновременно проводился для 3 млн. поколений. Температура была эмпирически установлена на 0,2 и допускала выборку деревьев через каждые 500 поколений. Расчетный размер выборки (ESS) этого анализа превысил 500 для всех параметров. Итоговое среднее стандартное отклонение частот расщепления было ниже, чем 0,02. Потенциальный коэффициент уменьшения масштаба (PSRF) для всех параметров составил 1,00, что означает статистическое достижение сходимости цепочек MCMC. Первые 25% деревьев были отбракованы как “burn-in” и консенсусное дерево по правилу большинства 50% было оценено с учетом апостериорных вероятностей. Полученное дерево было визуализировано в программе FigTree v1.4.4. Скорость дивергенции между последовательностями изучали с помощью вычисления p-distance для 16S рРНК в MEGA 5.0 и результат использовали для расчета матрицы сходства по формуле $[100 \times (1-p)]$ (в процентах).

Среди штаммов морфологически близких к *Leptolyngbya* (трихомы однорядные, зелено-голубого цвета, покрытые тонким бесцветным чехлом, с недифференцированными клетками; ложного ветвления в культуре не наблюдалось, присутствует фрагментация нитей внутри трихома; клетки дисковидные или изодиаметрические; перетяжки слабо выражены; концевая клетка закругленная, без калиптр; средняя ширина клеток составляет $1,5 \pm 0,1$ мкм, средняя длина – $0,9 \pm 0,1$ мкм; соотношение длины к ширине 0,7:1) было выделено несколько. Среди них согласно BLAST-анализу секвенированных последовательностей гена 16S рРНК штамм П52 имеет максимальное сходство с *Pseudophormidium* sp. SIK74 (97,4%). Последний был ранее обнаружен в гиполитных сообществах пустыни Сахара (Mehda et al., 2021). Стоит отметить, что при ML/BI филогенетическом построении он кластеризуется с недавно выделенным в отдельный род *Muxacorys* составляющего сестринскую кладу к *Leptolyngbya sensu stricto*. Согласно литературным данным известно, что межвидовые отличия последовательности гена 16S рРНК у *Muxacorys* может варьировать в пределах 96–99% (Pietrasiak et al., 2019). Вычисленные нами p-distances для нашего штамма показали, что сходство его 16S рРНК с классическим представителем клады *Leptolyngbya sensu stricto* (*L. boryana* UTEX В 485) составляет 91,4%, в то время как между собой они сходны на 98,8–99,5%. Для *M. californica* и *M. chilensis* этот показатель варьирует в пределах 97,1–97,67% для четырех штаммов и сравнение с *M. almedinensis* показало 96,94%. *P. americanum* оказался сходен с нашим штаммом на 98,79%, при этом с видами *Muxacorys* получены значения от 97,16% до 98,61%. Анализ вторичной структуры петли D1-D1' и В-бок последовательностей 16S-23S ITS штамма P52 и видов р. *Muxacorys* выявил его отличие как по количеству нуклеотидов, так и во вторичной структуре. Таким образом, основываясь на результатах проведенного анализа, было установлено сходство нового антарктического изолята как с *M. chilensis*, так и с *P. americanum*, что позволяет предложить, как ревизию ранее описанных таксонов, так и разработать новые критерии для их идентификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (Проект № 22-24-00590) на базе РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Хромас» и «Биобанк».

Литература

1. Mehda S., Muñoz-Martín M.Á., Oustani M., Hamdi-Aïssa B., Perona E., Mateo P. Lithic cyanobacterial communities in the polyextreme Sahara Desert: implications for the search for the limits of life // Environmental Microbiology. 2021. Т. 24. № 1. С. 451–474.
2. Mergelov N., Dolgikh A., Shorkunov I., Zazovskaya E., Soina V., Yakushev A., Fedorov-Davydov D., Pryakhin S., & Dobryansky A. Hypolithic communities shape soils and organic matter reservoirs in the ice-free landscapes of East Antarctica // Sci Rep. 2020. Т. 10. № 1.
3. Miller M.A., Pfeiffer W.T., Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees // 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). 2010.
4. Pietrasiak N., OsorioSantos K., Shalygin S., Martin M.P., Johansen J.R. When is a lineage a species? A case study in *Muxacorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) with the description of two new species from the Americas // J. Phycol. 2019. Т. 55. № 5. С. 976–996.
5. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. 2011. Т. 28. № 10. С. 2731–2739.

Анализ последовательностей белка TolC из *Escherichia coli*, ключевого компонента TolC-содержащих помп грамотрицательных бактерий

Радугина В.Н.¹, Назаров П.А.²

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва,
vassidze@gmail.com

² НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38292

Транспортеры (помпы) множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) являются краеугольным камнем защиты бактерий от антибиотиков. Помпы МЛУ составляют основу неспецифической защиты бактерий, в то время как модификация мишени лекарственного средства, инактивация лекарственного средства, переключение мишени или секвестрация мишени – специфическая линия их защиты. Сформированная помпами МЛУ неспецифическая защита формирует барьер, препятствующий попаданию антибактериальных веществ внутрь клетки, что является основным фактором, определяющим устойчивость бактерий [1].

В настоящее время известно шесть семейств помп МЛУ: MFS (major facilitator superfamily), MATE (multidrug and toxin extrusion), SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-cell division), PACE (proteobacterial antimicrobial compound efflux) и семейство ABC-транспортеров (ATP-binding cassette). ABC-транспортеры напрямую используют энергию АТФ для осуществления транспорта, тогда как остальные пять семейств являются вторичными активными транспортерами, использующими электрохимическую энергию трансмембранного потенциала [2].

TolC-содержащие транспортеры грамотрицательных бактерий являются обособленной группой из 8 транспортеров семейств RND, ABC и MSF, которые объединены одной особенностью – в составе каждого из них содержится порин наружной мембраны TolC. Одной из наиболее изученных помп МЛУ является помпа AcrAB-TolC (или AcrABZ-TolC) бактерии *E. coli*. Помпа AcrAB-TolC имеет довольно большую субстратную специфичность, откачивает субстраты из внутренней мембраны бактерии и периплазматического пространства и является основной помпой МЛУ для *E. coli* и близкородственных видов [3].

Исследование последовательностей помп представляет важную задачу понимания процессов образования новых клинических изолятов-супербактерий, так как резистентность за счёт оттока занимает важное место в общем числе резистентных бактерий, возникающих в следствии антибиотикотерапии. Считается, что гены, кодирующие помпы МЛУ, вариабельны и относятся к так называемым генам «роскоши», т.е. предназначены для адаптации бактерий к изменению окружающих условий. Однако анализ последовательностей AcrA, AcrB и TolC у основных лабораторных штаммов [4] показал, что штаммы из разных стран, культивируемые в лабораториях уже долгое время, имеют удивительную консервативность последовательностей белков помпы AcrAB-TolC.

В настоящей работе мы продолжили исследования последовательности белка TolC среди всех известных штаммов *E. coli*, выявили несколько консенсусных последовательностей, нашли все мутации и определили их частоты, рассчитали частоты замен аминокислот и получили исчерпывающую информацию о мутациях, влияющих на структуру белка TolC.

Данная работа поддержана грантами РФФИ № 20-015-00537 и РНФ № 22-15-00099.

Литература

1. Nazarov P.A. MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages. *Antibiotics* (Basel). 2022, 11(6):734. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.3390/antibiotics11060734.

2. Nazarov P.A., Kuznetsova A.N., Karakozova M.V. Multidrug resistance pumps as a keystone of bacterial resistance. Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2022, *in press*
3. Pos K.M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. Biochim Biophys Acta. 2009, 1794(5):782-93. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/j.bbapap.2008.12.015.
4. Karakozova M.V., Nazarov P.A. Conserved sequences of genes coding for the multidrug resistance pump AcrAB-TolC of *Escherichia coli* suggest their involvement into permanent cell “cleaning”. Bull. Russ. State Med. Univ. 2018, 2, 23–36.

Новые находки *Desarmillaria ectypa* на севере Западной Сибири

Рудыкина Е.А., Филиппова Н.В.

Югорский государственный университет,
lena-rudykina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38293

Armillaria (Fr.) Staude – широко распространенный род, состоящий в основном из патогенов растений. Виды этого рода являются плодовитыми производителями ризоморфов или вегетативных структур, которые при обнаружении часто связаны с инфекцией. Из-за их важности в качестве патогенов растений представляет интерес понимание эволюционного происхождения этого рода и того, как он получил всемирное распространение. В современной филогенетической реконструкции род разделен на два в зависимости от наличия (*Armillaria*) и отсутствия (*Desarmillaria*) кольца, что свидетельствует об отдельной эволюционной траектории [1]. Один из представителей рода – *Desarmillaria ectypa* (Fr.) R.A. Koch & Aime – является редким по всему миру и специфичным для болотных местообитаний видом.

Наблюдаемые в течение многих лет во всем мире осушение и деградация заболоченных территорий, болот и торфяников приводят к тому, что *D. ectypa* находится под критической угрозой исчезновения по всей Европе. В 11 из 17 стран, где вид был найден, он был включен в Красный список грибов. Тенденции в России неизвестны, но угроза успешному существованию местонахождений вероятно из-за очень малой площади пригодных местообитаний [2].

Материалы и методы

Во время полевых исследований в 2022 году в Ханты-Мансийском районе была обнаружена новая для Западной Сибири находка *D. ectypa*. Для этого региона данный вид в 2013 году был внесен в Красную книгу ХМАО-Югры (2 категория) [3]. Макропризнаки изучались нами по фотографиям, хранящимся в базе данных Фунгария Югорского государственного университета, а также под лупой на эксиккатах. Измерения микропризнаков высушенных образцов производились нами с помощью программы AxioVision, которая обрабатывает изображения микроструктур, сделанные с помощью камеры на микроскопе. Препараты монтировали в растворе щелочи (10%) с добавлением красителя (Congo Red) для окрашивания бесцветных микроструктур.

Полученные результаты

Описание собранных образцов *D. ectypa* сравнивались с описаниями видов опубликованных в литературе, где утверждалось, что основным различием *Desarmillaria* является отсутствие кольца на ножке, характерное для близкородственного таксона *Armillaria*. Из основных особенностей, на которые необходимо обратить внимание – гигрофанная, выпуклая шляпка с небольшим тупым бугорком или с вдавленным центром, размером 2–5 см в диаметре; довольно узкие низбегающие пластинки; бледно-охристый оттенок шляпки и ножки; ножка (5–10×0,5–1,5 см) цилиндрическая, слегка утолщена у основания, без кольца. Образец соответствовал всем перечисленным макропризнакам, что свидетельствует о высокой степени сходства найденной находки с *D. ectypa*.

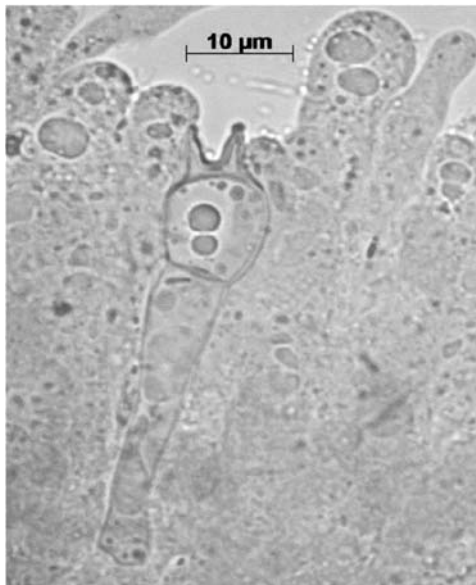


Рис. 1. *Desarmillaria ectypa* (YSU-F 12188):
базидия с перегородкой

При микроскопировании было отмечено, что споры (6,2–9,8×4,9–7 мкм), в среднем 1,2–2 мкм, яйцевидной формы. Базидии (21,1–41,2×4,7–10 мкм) с 4 стеригмами со средней длиной 5 мкм, булабовидные, 4-споровые, наблюдалось наличие 1–2 перегородок (рис. 1). Микроморфометрические признаки были схожи с литературными описаниями, отличительными особенностями стали более вытянутая форма спор и наличие перегородок в базидиях у изученного образца [4, 5].

Для подтверждения микро- и макро-морфометрических исследований был проведен молекулярно-генетический анализ образца. ДНК выделяли из эксиката с использованием набора TransDirect® Plant Tissue PCR Kit. ПЦР была проведена для получения данных о последовательности из области внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), используя пару праймеров ITS1(F)/ITS4. Сгенерированная нами последовательность ITS использовалась в качестве запроса в инструменте поиска сходства последовательностей – NCBI BLAST для поиска в базе данных нуклеотидов NCBI. Анализ молекулярной последовательности показал 98% сходства с *D. ectypa*. Всего с хорошим совпадением было найдено 12 последовательностей, все они имеют происхождение из работ, посвященных

реvisionsи рода *Armillaria*, поэтому достоверны.

Изученный образец

Место находки: Ханты-Мансийский автономный округ, Ханты-Мансийский район, в окрестностях Западно-Сахалинского нефтяного месторождения, осоково (*Carex diandra*, *C. chordorrhiza*) – болотно-отравно-гипновое болото, на сфагнуме *Hypnum*, 21 08 22, собр. И.В. Филиппов, опр. Е.А. Рудыкина (61.43638 с.ш., 70.75972 в.д.). Образец хранится в коллекции Фунгария ЮГУ (YSU-F-12188).

Общее распространение и экология

D. ectypa является редким евразийским видом во всем своем ареале, с большинством зарегистрированных (>60 находок) в Европе. В России известно только шесть местонахождений (Ленинградской, Московской, Томской, Тульской областях и на севере Западной Сибири в Советском и Сургутском районах). Он также зарегистрирован в Японии и Китае. В большинстве работ указывается, что вид обитает в переходных богатых известью торфяниках.

На севере Западной Сибири вид произрастает на торфяных болотах с pH 5,5–6, что расширяет представление об экологии вида и его приуроченности к разным типам болот. Таким образом, опираясь на известные ареалы вида есть возможность экстраполировать потенциальные места обитания *D. ectypa* в регионе.

Литература

1. Koch R.A. et al. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster* // BMC Evolutionary Biology. – 2017. – Т. 17. – №. 1. – С. 1–16.
2. Svetasheva T. 2015. *Armillaria ectypa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T75097245A75098379. [https://dx.DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T75097245A75098379.en](https://dx.doi.org/10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T75097245A75098379.en). (дата обращения: 09.10.2022).
3. Звягина Е.А. Охраняемые виды грибов: оценка статуса редкости в естественных сообществах средней тайги Западной Сибири // Б 40 Безопасный Север – чистая Арктика: сборник научных трудов. – 2018. – С. 62.
4. Ohenoja E. *Armillaria ectypa*, a vulnerable indicator of mires // Acta Mycologica. – 2006. – Т. 41. – № 2.
5. Stasinska M. *Armillaria ectypa*, a rare fungus of mire in Poland // Acta Mycologica. – 2015. – Т. 50. – № 1.

Новые психротолератные анаэробные бактерии из арктических криопэггов

Рыжманова Я.В., Трофимов А.С., Трубицын В.Э., Сузина Н.Е., Щербакова В.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
ryzhmanova@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38294

Криопэги – закрытые водные системы морского происхождения, залегающие в мерзлых толщах возрастом 6–120 тысяч лет на глубине нескольких десятков метров в виде линз хлоридно-натриевых вод, характеризующиеся постоянными отрицательными температурами и высокой минерализацией (60–300 г/л). Как показали исследования последнего десятилетия, криопэги населены активным микробным сообществом, длительно существующим в условиях отрицательных температур и высокой солености.

Цель работы

Выделить новые таксоны психротолерантных анаэробных микроорганизмов из криопэггов полуострова Ямал.

Объект исследования

Накопительные культуры сульфатредуцирующих бактерий от 30.07.2007 г. из образцов воды ямальских криопэггов 1У (Бованенковское газовое месторождение, глубина отбора 120 м, рН 7.9, минерализация 14.6 г/л) и 2У (Устье реки Яра-Яха, глубина отбора 5 м, рН 7.4, минерализация 56.23 г/л).

Результаты

Для получения колоний использовали метод десятикратных разведений на жидких и твёрдых средах с последующей инкубацией при температурах 6 и 20 °С в течение 3 недель. В результате пересева отдельных колоний из криопэга 1У были выделены штаммы бактерий, обозначенные нами как К1/0, К1/6, К1/7, К1/8 и К1Тг. Из криопэга 2У был выделен штамм, обозначенный нами К2S.

Микроскопирование клеток штаммов К1/0, К1/6, К1/7 и К1/8 показало, что все они представлены одиночными или двоянными грамположительными короткими неспорообразующими палочками с закругленными концами размером 0.5–0.7×1.4–1.5 мкм (рис. 1А). В логарифмической фазе роста клетки подвижны, в стационарной фазе роста теряют подвижность. Клетки штамма К1Тг неподвижные, располагаются поодиночке, парами, короткими цепочками или собраны в неправильные конгломераты, имеют кокковидную или овоидную форму размером 1.0–1.5 мкм, не образуют споры и по Граму окрашиваются вариабельно (рис. 1Б). Клетки штамма К2S представлены тонкими прямыми неподвижными грамположительными палочками размером 2.0–5.0×0.5 мкм (рис. 1В).

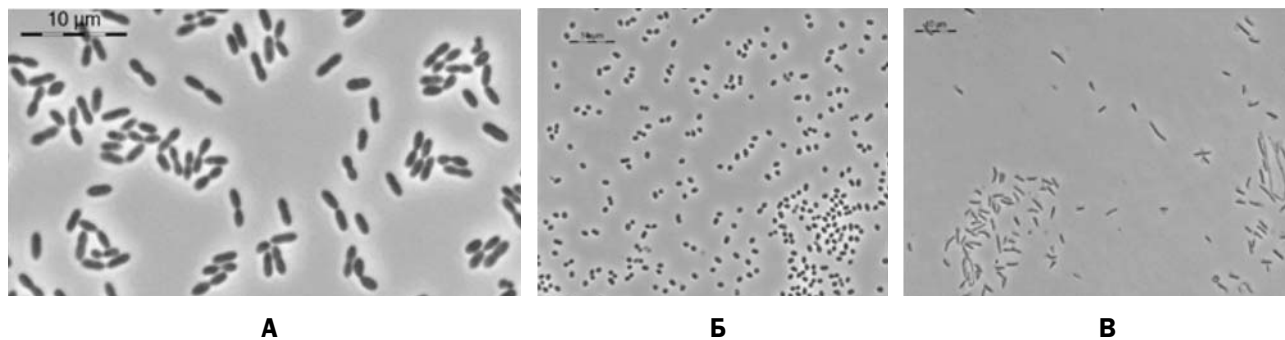


Рис. 1. Морфология клеток штаммов К1/6 (А), К1Тг (Б) и К2S (В), фазовый контраст

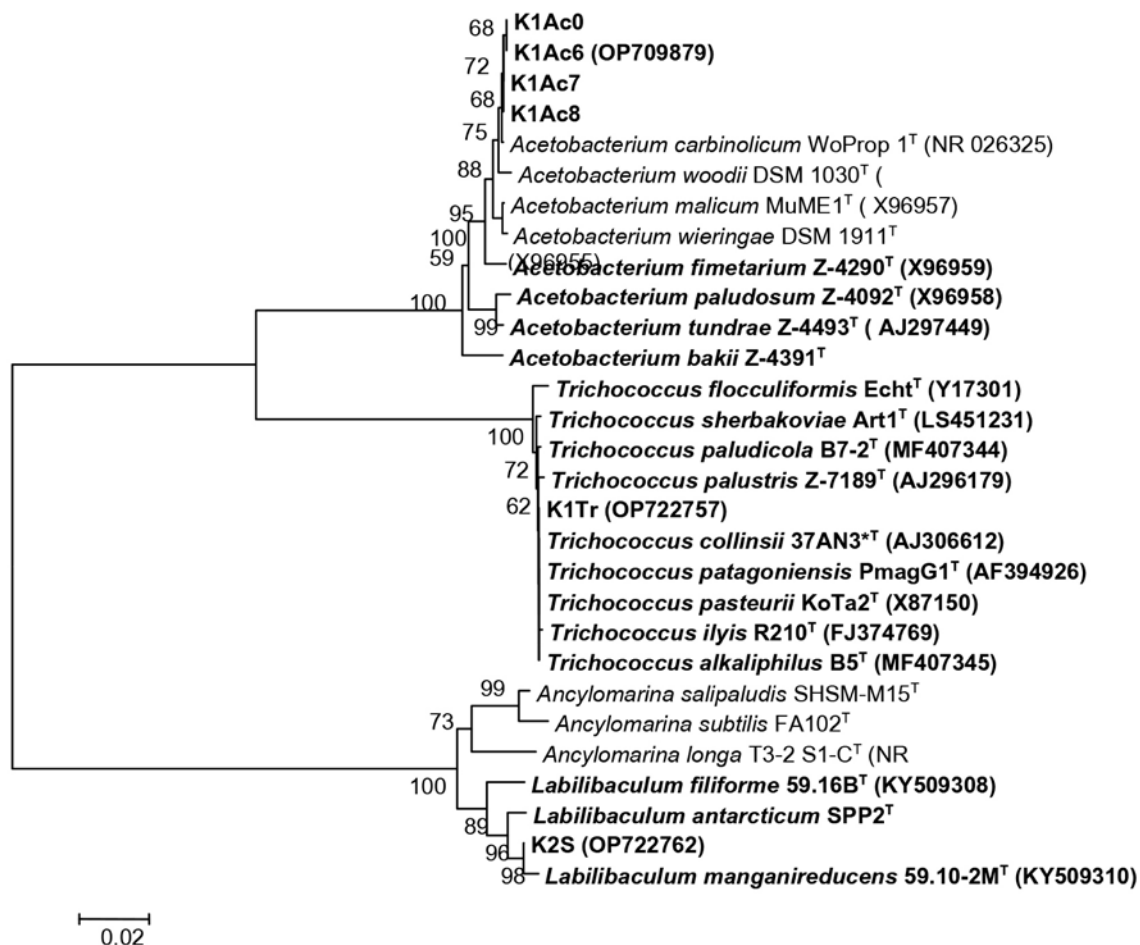


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (1207 н.о.), показывающее положение штаммов K1/0, K1/6, K1/7, K1/8, K1Tr и K2S среди представителей родов *Acetobacterium*, *Labilibaculum* и *Trichococcus*. Психротолерантные виды показаны **жирным шрифтом**. Длина масштабной линейки: 2 замены на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “neighbour-joining”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления

Филогенетический анализ гена 16S рРНК (рис. 2) показал, что изоляты K1/0, K1/6, K1/7 и K1/8 являются новыми штаммами ацетогенных бактерий уже известного вида *Acetobacterium carbinolicum* (сходство 99.91%). Все четыре штамма облигатные анаэробы, способны расти гетеротрофно на бетаине, лактате, пирувате, формиате, глицерине, метаноле, этаноле, этиленгликоле, глюкозе, фруктозе, дрожжевом экстракте, казामीновых кислотах, триптиказе, пептоне, а также автотрофно на смеси H_2 и CO_2 .

Штамм K2S принадлежит к роду *Labilibaculum*, все известные представители которого обнаружены в морских экосистемах. Штамм K2S, вероятно, является новым видом рода *Labilibaculum* с ближайшим родственником *Labilibaculum manganiireducens* SPP2^T (сходство 98.70%), что необходимо подтвердить данными полногеномного секвенирования. Штамм K2S облигатный анаэроб, гетеротроф, использует для роста моно- и дисахара, а также пируват, лактат и глицерин.

Филогенетический анализ гена 16S рРНК штамма K1Tr выявил 100% сходство с *Trichococcus patagoniensis* и *T. collinsii*. Однако данные ДНК-ДНК гибридизации и ANI свидетельствуют о том, что ближайшим родственником штамма K1Tr является *T. alkaliphilus* B5^T со сходством 63.1 и 93.33% соответственно. Это позволяет утверждать, что штамм K1Tr представляет собой новый вид рода *Trichococcus*. Штамм K1Tr является факультативным анаэробом, хемоорганотрофом с широкой субстратной специфичностью.

Таким образом, из криопэггов выделены 6 штаммов бактерий различных физиологических групп: ацетогенные бактерии, являющиеся конечными деструкторами органического вещества, гетеротрофная

бактерия *Labilibaculum* sp. K2S и хемоорганотрофная бактерия *Trichococcus* sp. K1Tr. Все изоляты являются психротолерантными и способны расти при температуре 6 °С. Штаммы K1/0, K1/6, K1/7, K1/8 и K1Tr не требуют для роста ионы Na⁺, но при этом способны выдерживать соленость до 70 г/л NaCl в среде. Данные бактерии, вероятнее всего, попали в воду криопэга из окружающих многолетнемерзлых отложений. Штамм K2S, как и большинство представителей семейства *Marinifilaceae*, облигатный галофил и, по всей видимости, является аборигенным обитателем криопэга.

Особенности влияния тяжёлых металлов на микробный ценоз почвы на примере тест-культур *Rhizobium trifolii* и *Bacillus subtilis* in vitro

Савченко А.А., Харина Е.И.

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
(Медико-биологический факультет, базовая кафедра микробиологии),
anna.stavickaya.ncfu@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38295

На сегодняшний день во всем мире одной из актуальных проблем является изучение антропогенного воздействия на почву, так как именно она является первостепенным индикатором общей техногенной обстановки в природе.

Почва – экологическая среда, в которой формируется особый тип биоценоза, в основе которого лежит корневая система растений и почвенный микробиоценоз. Загрязнения поступают в почву постоянно, преимущественно с атмосферными осадками, поверхностными отходами, почвенными породами и подземными водами, поэтому в данное время среди основных почвенных загрязнителей тяжёлые металлы по степени опасности занимают центральное место.

Повышенное внимание к проблеме загрязнения почвы тяжёлыми металлами связано ещё с тем, что быстрое самоочищение почв в условиях высокой антропогенной нагрузки крайне затруднено, а в ряде случаев попросту невозможно. В современных условиях все больше внимания уделяется экологическим способам очищения почв таким как, биоремедиация. Основную роль в этом процессе играют почвенные бактерии. Многие из них адсорбируют на себя ряд тяжёлых металлов, тем самым способствуют очищению почвы. Для других микроорганизмов небольшие концентрации тяжелых металлов оказывают стимулирующее действие, тем самым обогащается почва, улучшается ее плодородие.

Одними из индикаторов почвенного плодородия являются азотфиксирующие бактерии, которые способны получать азот из атмосферы и снабжать им растения, из-за чего синтезирующая способность почвы возрастает. Так же велика роль представителей рода *Bacillus*, почвенных продуцентов таких экзоферментов, как протеаза, амилаза, фосфатаза, фосфолипаза и других. В связи с этим в качестве объекта исследования нами были выбраны почвенные культуры *Rhizobium trifolii* и *Bacillus subtilis*, выделенные и идентифицированные из образцов почв жилой зоны города Ставрополя. Предметом исследования явилось влияние таких тяжёлых металлов как никель, кадмий, железо и марганец на рост и культуральные свойства микроорганизмов.

Выделение и идентификацию почвенных микроорганизмов проводили по общепринятым методикам (3). Исследование влияния разных концентраций тяжелых металлов на культуры исследуемых микроорганизмов проводили луночным методом, а также для подтверждения полученных результатов провели метод посева в питательную среду, в ходе которого осуществили подсчет жизнеспособных микроорганизмов, которые образовали колонии (1).

Для исследования были взяты ПДК (предельно допустимая концентрация) железа (200 мг/кг), марганца (1500 мг/кг), кадмия (2 мг/кг) и никеля (4 мг/кг) и превышение ПДК этих металлов в 2 раза. Подбор именно таких концентраций тяжелых металлов в первую очередь связан с повышенной антропогенной нагрузкой на почвы, что само по себе вызывает увеличение концентрации некоторых тяжелых металлов в почве (2).

При действии различных концентраций никеля на *Rhizobium trifolii* in vitro была выявлена задержка роста в образце с ПДК и превышающей ее в два раза ($d = 1,2 \pm 0,3$ и $8,3 \pm 0,3$ мм) тест-культуры, без изменения культуральных признаков бактерий, другие тяжелые металлы не вызвали изменений в росте данной культуры (табл. 1).

Стоит отметить, что при методе посева в среду никель и железо обладали выраженными ингибирующими свойствами, замедляя рост культуры, а марганец и железо наоборот усиливали рост колоний *Rhizobium trifolii*, обладая катализирующим воздействием (табл. 2).

При действии железа на *Bacillus subtilis* in vitro было выявлено повышение активности роста тест-культуры при ПДК ($d = 10,2 \pm 0,1$ мм) и увеличении ПДК в 2 раза ($d = 14,4 \pm 0,1$ мм), без изменения культуральных признаков, другие тяжелые металлы не вызвали изменений в росте культуры (табл. 3).

Стоит отметить, что при методе посева в среду никель, кадмий и марганец усиливали рост колоний *Bacillus subtilis* незначительно, а максимальный рост колоний наблюдался при действии железа (табл. 4).

В ходе проведенного исследования, мы пришли к выводам, что с повышением концентрации никеля и железа снижается активность почвенной культуры *Rhizobium trifolii*, а кадмий и марганец – усиливают рост данной культуры. Высокие концентрации железа оказывают стимулирующее действие на рост *Bacillus subtilis*, в то время, как никель, кадмий и марганец – практически не влияют на рост культуры.

Таблица 1

Результаты влияния различных концентраций металлов на *Rhizobium trifolii* in vitro (методом лунок)

№ п/п	Тяжелый металл Степень концентрации	ДЗЗР $X \pm m_x$ (mm)*			
		Никель (Ni)	Кадмий (Cd)	Железо (Fe)	Марганец (Mn)
1	Норма ПДК в почве	1,2±0,3	0	0	0
2	Превышение ПДК в 2 раза	8,3±0,3	0	0	0
3	Контроль	0	0	0	0

* Примечание: X – среднее значение ДЗЗР; m_x – относительная погрешность измерения.

Таблица 2

Количественное определение тест-культуры *Rhizobium trifolii* in vitro при действии различных концентраций тяжёлых металлов (методом посева в среду)

№ п/п	Тяжелый металл Степень концентрации	Количество колоний $X \pm m_x$ (n)			
		Никель (Ni)	Кадмий (Cd)	Железо (Fe)	Марганец (Mn)
1	Норма ПДК в почве	211,4±9	854,3±30	70,9±11	512,2±24
2	Превышение ПДК в 2 раза	180,2±8	938,3±36	24,8±4	608,6±28
3	Контроль	323,2±9	323,2±9	323,2±9	323,2±9

Таблица 3

Результаты влияния различных концентраций тяжелых металлов на *Bacillus subtilis* in vitro (методом лунок)

№ п/п	Тяжелый металл Степень концентрации	ДЗЗР $X \pm m_x$ (mm)			
		Никель (Ni)	Кадмий (Cd)	Железо (Fe)	Марганец (Mn)
1	Норма ПДК в почве	0	0	10,2±0,1	0
2	Превышение ПДК в 2 раза	0	0	14,4±0,1	0
3	Контроль	0	0	0	0

Подсчёт количества колоний *Bacillus subtilis* in vitro при действии различных концентраций тяжёлых металлов (методом посева в среду)

№ п/п	Тяжелый металл Степень концентрации	Количество колоний $X \pm m_x$ (n)			
		Никель (Ni)	Кадмий (Cd)	Железо (Fe)	Марганец (Mn)
1	Норма ПДК в почве	519,2±21	512,3±18	895,3±32	529,6±20
2	Превышение ПДК в 2 раза	527,6 ±24	525,2±21	1246,8±36	531,4±22
3	Контроль	468,5±14	468,5±14	468,5±14	468,5±14

Литература

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргер. – М.: Медицина, 1982. – 340 с.
2. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 58595-2019 «Почвы. Отбор проб», 2019.
3. Хоулт Д. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Д. Хоулта, Н. Крига, П. Сниттаи др. – М.: Мир, 2007. – 467 с.

Разнообразие бактериальных сообществ и химических компонентов в микрочастицах городов, расположенных в разных климатических поясах

Сазонова О.И.¹, Ветрова А.А.¹, Слуковская М.В.^{2,4}, Корнейкова М.В.^{2,3}, Васенев В.И.²,
Иващенко К.В.^{1,2}, Новиков А.И.⁴, Иванова А.А.¹, Помеджони П.⁵, Маттиони К.⁵,
Ристорини М.^{5,6}, Оккиутто Д.⁶, Канепари С.⁷, Гавричкова О.В.^{2,5}

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, РФ,
sazonova_oi@rambler.ru

² Российский университет дружбы народов, РФ

³ Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, Апатиты, РФ

⁴ Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева
(ИХТРЭМС КНЦ РАН), Апатиты, РФ

⁵ Научно-исследовательский институт наземных экосистем,
Национальный исследовательский совет, Порано, Италия, e-mail: olga.gavrichkova@cnr.it

⁶ Региональное агентство по охране окружающей среды Лацио, Рим, Италия

⁷ Университет Сапьянца, Рим, Италия

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38296

Взвешенные в воздухе частицы тонкой пыли (ТП) признаны одними из самых вредных загрязняющих веществ для здоровья человека в городах. В последние несколько лет, наряду с физическими и химическими характеристиками, все большее внимание уделяется биогенной фракции ТП – микробиому. В отличие от микробного сообщества почв и поверхностных вод, изученных достаточно хорошо, характеристики воздушного микробиома до сих пор остаются относительно малоизученными. Факторы, влияющие на формирование и активность микробного сообщества ТП многочисленны, и требуют тщательной оценки. Целью работы являлось комплексное исследование биологических и химических характеристик ТП в урбоэкосистемах различных по своим климатическим характеристикам. Для реализации поставленных целей были выбраны три города, расположенных в разных климатических поясах: Мурманск (субарктический климат, среднегодовая температура 0,6 °С), Москва (умеренный, континентальный климат, среднегодовая температура 5,8 °С), Рим (средиземноморский климат, среднегодовая температура 15,9 °С). В каждом городе были выделены три зоны, отличающиеся функциональной на-

грузкой – зона интенсивного дорожного движения, жилая (селитебная) зона и рекреационная зона (фоновая). В каждой зоне были установлены пробоотборники ТП для отбора фракции размером до 10 мкм на фильтры. Отбор пыли производили летом, в пик вегетационного сезона. Для определения химической составляющей ТП был использован метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой – мультиэлементный метод анализа, позволяющий определять большое число элементов с низкими и ультранизкими пределами определения. Детальное изучение микробного сообщества ТП было выполнено с помощью метабаркодинга.

Химический анализ воздушной пыли Москвы и Мурманска выявил увеличение содержания в направлении от фоновой зоны к зоне с максимальной антропогенной нагрузкой, таких металлов как алюминий, титан, марганец, железо, а также кремния. В Риме в зоне трафика наблюдалось увеличение содержания металлов, связанных с транспортным загрязнением (медь, железо, молибден, олово, сурьма и др.). Следует отметить, что в Мурманске в зоне трафика содержание алюминия было в 170 раз выше, чем в рекреационной зоне, в Москве – в 26 раз, тогда как в Риме содержание алюминия превосходило рекреационную зону только в 1.5 раза. Кроме того, в Мурманске в направлении увеличения антропогенной нагрузки функциональных зон города выявлен положительный градиент для ванадия, а в Москве – для кальция.

Для бактериальных сообществ ТП воздуха Москвы было идентифицировано 35 типов, 85 классов и 216 порядков. Для бактериальных сообществ ТП воздуха Рима был идентифицирован 21 тип, 47 классов и 125 порядков. Для бактериальных сообществ ТП воздуха Мурманска было идентифицировано 37 типов, 88 классов и 215 порядков. Доминирующими типами в бактериальных сообществах ТП воздуха всех изучаемых городов были *Proteobacteria* (22–39% первый преобладающий тип), *Actinobacteria* (10–22% второй преобладающий тип), *Firmicutes* (4–10%), *Bacteroidetes* (7–9%) и *Cyanobacteria* (2–4%). Среди доминирующих типов всех исследованных образцов именно для *Bacteroidetes* выявлен положительный антропогенный градиент в направлении от рекреационной зоны к зоне трафика. В этом же направлении для *Cyanobacteria* положительный градиент обнаружен только для ТП воздуха Москвы и Мурманска, а для ТП воздуха Рима градиент оказался отрицательным. Следует отметить, что в Мурманске удаленность от зоны интенсивного дорожного движения влияет на количество операционно таксономических единиц (ОТУ) в ТП воздуха (на каждом таксономическом уровне), а именно происходит увеличение ОТУ в направлении от рекреационной зоны к зоне трафика. Подобное не отмечено для образцов ТП воздуха Москвы и Рима.

Полученные знания могут быть использованы для реализации моделей глобального и локального распределения микроорганизмов, для обновления критериев качества воздуха, а также для создания эффективной системы биомониторинга, способствуя тем самым устойчивому развитию городской среды и улучшению качества жизни городского населения.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, номер проекта: 19-05-50112.

Первичные данные о культивируемых микроскопических грибах в фито-очистных сооружениях

Сайнчук А.Д.^{1,2}, Александрова А.В.², Харитонов С.Л.², Щеголькова Н.М.²

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
alexandra49@inbox.lv

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38297

Зачастую деятельность человека может оказывать негативное влияние на окружающую среду, при этом одним из аспектов отрицательного воздействия является загрязнение вод [1]. Данная проблема проявляется не только в общем ухудшении экологической обстановки, но и в критичных последствиях для

здоровья, экономики и быта самого человека. По этой причине необходимо искать, модернизировать и популяризировать методы нивелирования негативного влияния человека на экологическую обстановку. Сегодня в очистке вод используется комбинированный подход – применяются механические, физические, химические и биологические методы. Биоремедиация сравнительно молодой способ водоочистки, успевший стать распространенным за счёт своей эффективности, простоты, надёжности и относительно невысокой стоимости [2]. К новому перспективному методу биологической очистки относится фиторемедиация или фито-очистка. Специфика фито-очистных сооружений (ФОС) заключается в многокомпонентности системы, включающей растения, бактерии и грибы [3]. Каждый участник процесса не только сам удаляет загрязнители, но и повышает эффективность и стабильность целой очистной системы, выступая в роли средообразователя для других компонентов [4]. На сегодняшний день информации о грибах и их роли в ФОС значительно меньше, чем о растениях и бактериях, несмотря на значительный потенциал грибов к утилизации и метаболизации широкого спектра загрязнителей [3].

Цель работы – получение максимально широких сведений о культивируемых микроскопических грибах, присутствующих в фито-очистных сооружениях при различных условиях.

В работе были использованы образцы из ФОС, расположенных в зоне умеренного климата (Нидерланды). Образцы представляли собой донные осадки, поверхностную и прикорневую почву, до обработки хранились в замороженном состоянии. Образцы отбирали в шести очистных комплексах с горизонтальным подповерхностным потоком, все исследованные ФОС были засажены тростником (*Phragmites australis*). Суммарно отобрали 11 проб.

Выделение микромицетов из образцов выполнили методом посева на твердые питательные среды из серийных разведений. Провели подсчет общего числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и количества различных морфотипов колоний в каждом образце. Выделили чистые культуры, для идентификации использовали общепринятые определители. Наименования видов и систематическое положение дано по базам данных: Myco Bank (<http://www.mycobank.org>) и Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

Представленность видов оценивали по показателям относительного обилия видов. В качестве показателя разнообразия видов в работе использовали индекс разнообразия Шеннона. Для получения наглядной картины сравнения состава микромицетов из разных субстратов и местообитаний был использован метод ординации, который позволяет расположить комплексы видов из каждого образца вдоль гипотетических осей, опираясь на данные видового состава и представленности. Для этой цели был проведен анализ методом главных компонент в программе PCO3.

В образцах было выявлено 44 вида микромицетов и 4 морфологических типа неспорулирующих культур. Их количество в каждом конкретном образце варьировало от 3 до 15. Индекс разнообразия Шеннона изменялся в пределах 0.63–2.09, что говорит о сильной гетерогенности образцов и достаточно высоком разнообразии, сравнимым с таковыми показателями для почв. При анализе комплексов микромицетов из образцов закономерностей в группировке по субстрату или по локализации в очистных сооружениях выявлено не было. Однако комплексы видов группируются по сооружениям, из которых они были получены.

Самыми частыми и обильными в обследованных ФОС Нидерландов были следующие виды: *Cephalotrichum microsporum*, *Fusarium* sp., *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium paxilli* и *Trichoderma hamatum*.

Среди идентифицированных культур оказалось более 20 родов и видов (таких как *Penicillium ochrochloron* и *Trichoderma harzianum*), потенциально участвующих в процессах биоремедиации. Следует отметить высокое обилие видов, способных не только развиваться на растительных остатках, но и вызывать заболевания растений (*Acrostalagmus luteoalbus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Gonytrichum macrocladum*, *Paraphaeosphaeria sporulosa*, *Phoma herbarum*, *Plectosphaerella cucumerina*), а также присутствие видов-токсинообразователей.

Согласно литературным данным, выявленные виды потенциально могут участвовать в очистке воды от широкого спектра поллютантов, таких как стойкие органические загрязнители, полициклические ароматические углеводороды, металлы и их соединения, сырая нефть и прочие [5]. Таким образом, проведенный анализ видового состава культивируемых микроскопических грибов в разных зонах фито-очистных сооружений показал, что микроскопические грибы очень разнообразны и обильны в данных типах местообитаний и, вероятно, играют существенную роль в функционировании искусственных экосистем ФОС.

Работа была поддержана грантом МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ «Депозитарий живых систем Московского университета» в рамках Программы развития МГУ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1051.

Литература

1. Singh M.R., Gupta A. Water pollution-sources, effects and control. Pointer Publishers Jaipur. 2016.
2. Tiyaasha S., Bhagat S. Phyto-Filtration: A New Approach of Waste Water Treatment // International Journal of Engineering and Innovative Technology. 2013. Vol. 3(2). P. 447–453.
3. Рыбка К.Ю., Щеголькова Н.М., Алмашин Д.С., Скрипчинский А.К. Использование фито-очистных систем для очистки от ксенобиотиков в климатических условиях России // Вода: химия и экология. 2015. № 7. С. 32–42.
4. Singh R.K., Tripathi R., Ranjan A., Srivastava A.K. Fungi as potential candidates for bioremediation // Abatement of Environmental Pollutants. 2020. P. 177–191.
5. Deshmukh R., Khardenavis A.A., Purohit H.J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation // Indian journal of microbiology. 2016. Vol. 56(3). P. 247–264.

Динамическая микроэкология и эволюционная биология развития: объекты и методы

Скобликов Н.Э.^{1,2,3}, Зимин А.А.⁴

¹ ФГБНУ Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии (КНЦЗВ)

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России

³ ООО «СЛ МедикалГруп», skoblikow@yandex.ru

⁴ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38298

В нашей предыдущей работе были рассмотрены общие подходы, принципы и перспективы изучения микробиомов в возрастной (онтогенетической) и эволюционной (филогенетической) динамике [1].

Касаясь изучаемых объектов, следует подчеркнуть значимость включения в анализ не только бактериального и вирусного компонентов (вирусов как эукариотического host'a, так и бактериофагов), но и плазмид и иных генетических мобильных элементов [2].

Относительно методов изучения, следует особо отметить, что современные методы структурной оценки микробиоценоза с использованием метагеномного анализа или ГХ-МС-анализа, конечно, позволяют получить более полную информацию о биоразнообразии исследуемого микробного сообщества, позволяя оценить спектр микроорганизмов с гораздо большей широтой (включая некультивируемые формы) и точностью. Однако, их использование характеризуется рядом принципиальных ограничений: 1) почти не оценивают реализацию генетического потенциала микроорганизмов (баланс свободных вирионов литических фагов и интегрированных профагов, фагорезистентность, антибиотикорезистентность, псевдолизогенез – эффекты, оцениваемые фенотипически); 2) не оценивает характер взаимоотношений выделенных из одного образца конкретных микроорганизмов-антагонистов (бактерий и фагов); 3) почти не позволяет оценить принадлежность нехромосомных генетических носителей (плазмид) к конкретному бактериальному изоляту (и, таким, образом, отследить распространённость и пути их переноса в популяции данного экотопа).

Метагеномный анализ очень информативен для оценки полного биоразнообразия микробиома. Однако, если целью исследований является не только оценка генетического разнообразия, сколько оценка функциональных взаимоотношений компонентов микробиоценоза, причём в динамике, незаменимы-

ми остаются классические методы микробиологии, основанные на выделении изолятов и изучении их свойств и взаимодействия *in vitro*. Так можно определить симбиотические и антагонистические (антибиотические) эффекты, проявляемые микроорганизмами относительно друг друга, которые, вероятно, являются одной из причин онтогенетической динамики микробиомов.

Результаты проведенных исследований показывают, что причины наблюдаемой сверхбыстрой смены изолятов бактерий и соответствующих фагов в возрастной динамике, остаются по-прежнему неясными, не похожими, вопреки ожиданиям, на волны типа «хищник-жертва» [3, 4, 5].

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-230040-р_а.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного Фонда и ООО «СЛ МедикалГруп» в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/10.

Литература

1. Скобликов Н.Э., Зимин А.А. Динамическая микроэкология и эволюционная биология развития: подходы и перспективы // VII Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школа-конференция для молодых учёных, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. М.: ГЕОС, 2021. – С. 87–88. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.34756/GEOS.2021.17.37920
2. Скобликов Н.Э., Зимин А.А. Анализ возрастной динамики микроэкологической системы *E.coli* «бактерия-фаг-плазида» кишечного микробиоценоза свиней // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 16–21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. С. 38.
3. Скобликов Н.Э., Забашта Н.Н., Москаленко Е.А., Зимин А.А. Исследование смены штаммов *E.coli* кишечного микробиоценоза поросят при применении пробиотика на основе *L.paracasei* / Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Сборник научных трудов СКНИИЖ по материалам 8-й научно-практической конференции. Ч. 1 / СКНИИЖ – Краснодар, 2015. – С. 42–46.
4. Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А. Особенности динамики титра *E.coli* нормофлоры гусят в первые семь недель жизни // III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов / под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2016. С. 62.
5. Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А. Особенности динамики титра колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни // IV Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов / под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017, С.93-94.

Микобиота новообразованных почв на отходах обогащения редкометалльных руд в Мурманской области

Сошина А.С.¹, Корнейкова М.В.^{1,2}, Слуковская М.В.^{1,2}, Иванова Т.К.¹,
Красавцева Е.А.¹, Максимова В.В.¹, Мосендз И.А.¹

¹Кольский научный центр РАН, г. Апатиты, anastasiya.soshina97@yandex.ru

²Российский университет дружбы народов, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38299

При разработке месторождения лопаритовых руд в Мурманской области образовались нарушенные ландшафты. Огромное количество поллютантов, накопленных в течение длительного периода привело к нарушению биогеохимических процессов, в связи с чем восстановительная сукцессия на этих ландшафтах крайне затруднена. Естественное самозаращение нарушенных территорий в условиях Субарк-

тики – процесс крайне медленный, что связано с коротким вегетационным периодом. Важнейшими индикаторами экологического состояния техногенно загрязненных почв являются численность и разнообразие микробного сообщества, в том числе микроскопических грибов. Целью данной работы было исследование количественных и качественных характеристик сообществ микроскопических грибов в хвостах обогащения лопаритовых руд и новообразованных почв, сформировавшихся на участке нефелинового хвостохранилища.

Почвенные пробы были отобраны по градиенту от эмбриозема инициального до фоновой почвы в 2021 году. Численность и разнообразие микроскопических грибов определяли методом посева на плотные селективные питательные среды. Представленность видов оценивали по показателю относительного обилия видов. В качестве показателя видового разнообразия использовали индекс Шеннона. Длину и биомассу мицелия грибов определяли методом флуоресцентной микроскопии с помощью микроскопа Zeiss. Использовали темноокрашенные поликарбонатные мембранные фильтры Nucleopor Black с диаметром пор 0.8 мкм.

Нерекультивированные хвосты характеризовались низкой численностью микромицетов – менее 100 КОЕ/г субстрата. С появлением растительности численность микромицетов увеличилась в 2 и более раза и достигала в фоновой почве максимальных значений – более 22 тыс. КОЕ/г субстрата.

Биомасса и длина грибного мицелия, определенные методом прямого счета, в разных вариантах изменялись аналогичным образом. Известно, что наличие растительности является определяющим фактором для данных показателей: в техногенном субстрате без растительности длина грибного мицелия и биомасса были на порядок ниже, чем в вариантах с растительностью. При этом разница между вариантами с растительностью была несущественной. Так, в хвостах на начальной стадии зарастания длина грибного мицелия составила 1125 метра, в первичной почве – 1484 м/г, а в фоновой почве – 1674 м/г. Метод прямого счета, в отличие от метода посева, учитывает как живые, так и мертвые клетки. Вероятно, в хвостах с растительностью большое количество микромицетов находятся в неактивном состоянии, тогда как в фоновой почве – наоборот.

В техногенном субстрате без растительности видовое разнообразие микроскопических грибов представлено 4 видами, а индекс Шеннона равен 1,9. С индексом обилия 33% доминируют *Talaromyces funiculosus* и *Trichocladium griseum*. В хвостах на начальной стадии зарастания обнаружено 7 видов микроскопических грибов, индекс Шеннона равен 2,0, доминирует *Penicillium corylophilum* с индексом обилия 50%. Максимальное видовое разнообразие отмечено в первичной почве на хвостохранилище, где количество выделенных видов равно 11, а индекс Шеннона 2,6. В первичной почве доминирует *Mucor hiemalis* с индексом обилия 30%, а структура сообщества является наиболее выровненной. В фоновой почве видовое разнообразие представлено 4 видами, индекс Шеннона равен 1,3, наибольшие индексы обилия отмечены у *Trichoderma viride* (60%) и у *Aspergillus versicolor* (33%).

Таким образом, выявлено, что наличие растительности является определяющим фактором для численности и структуры сообщества микроскопических грибов в хвостах обогащения лопаритовых руд и новообразованных почв, сформировавшихся на участке нефелинового хвостохранилища.

Микробиота обследуемых в возрасте до 20 лет при дисбиозе толстого кишечника

Сулима М.О.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38300

Микробиота (микрофлора) – совокупность разных типов микроорганизмов (МО), населяющих биотопы организма человека, основным из которых является толстый кишечник, содержащий в своем составе около 98% всей микрофлоры. Микроорганизмы, населяющие толстый кишечник, обеспечивают

защиту от патогенных и условно-патогенных МО за счет своих антагонистических свойств, способности к образованию биопленки, синтезу различных веществ (Gensollen et al., 2016; LeBlanc et al., 2013).

Микробиота толстого кишечника все легче стала поддаваться влиянию внешних и внутренних факторов в результате применения антибиотиков, нерационального питания, стресса, действия экологических факторов и т.д., что приводит к изменению ее качественного и количественного состава (Andoh, 2016).

Дисбиоз (дисбактериоз) – качественное и количественное нарушение состава микрофлоры толстого кишечника. Согласно имеющимся данным, дисбиозом страдает более 90% взрослых и около 95% детей. Изменение состава микрофлоры ведет к нарушению ее нормального функционирования и сопровождается не только кишечными расстройствами, но и нарушением обмена веществ и даже дисфункцией головного мозга (Скворцов, 2017; Jandhyala et. al., 2015).

Материалы и методы

За период с 2020 г. по 2021 г. бактериологическому анализу на дисбиоз толстого кишечника подвергся биоматериал (содержимое толстого кишечника) от обследуемых следующих возрастных групп: I – (до 1 года), II (от 1 до 5 лет), III (от 6 до 20 лет) со следующими диагнозами, входящими в группу «Болезни органов пищеварения» (МКБ-10): недостаточность железа (E 61.6), умеренная белково-энергетическая недостаточность (БЭН) (E 44.0), диспепсия (K 30), аллергический и алиментарный гастроэнтерит и колит (K 52.2), гастродуоденит неуточненный (K 29.9), нарушение всасывания в кишечнике неуточненное (K 90.9). Общее количество биоматериала: 315. Из этого числа: 84 – от I возрастной группы, 49 – II, 182 – III. Бактериологическая диагностика проведена на базе лаборатории клинической микробиологии ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр» в период 2020–2021 гг. Культуральные и биохимические свойства определялись традиционным бактериологическим методом. Для анализа содержимого толстого кишечника использовались следующие питательные среды: Сальмонелла-Шигелла агар, кровяной агар с налидиксовой кислотой, Уриселект 4, агар Сабуро с хлорамфениколом, Эндо агар, Клостридия агар, цитратный агар Симмонса (ООО «Био-Рад Лаборатории»); среда Чапмана (ООО «БиоВитрум»); Энтерококкозель агар (ООО «Герда Групп»).

Результаты исследования

В I возрастной группе в 87% случаев высевался *S. aureus* как в монварианте, так и в ассоциациях с избыточным ростом других МО, реже – гемолитическая *E. coli* (69%) и *Klebsiella* spp. (41%). Обследуемые данной возрастной группы имели следующие сопутствующие дисбиозу толстого кишечника диагнозы: недостаточность железа (E 61.6) и умеренная белково-энергетическая недостаточность (E 44.0). У пациентов с недостаточностью железа в повышенной степени чаще высевался *S. aureus* – одиночно (37%) или в ассоциации с гемолитической *E. coli* (63%). У обследуемых с БЭН (E 44.0) *S. aureus* высевался одиночно или в ассоциации с *Klebsiella* spp. (50%).

Во II возрастной группе наблюдался избыточный рост *S. aureus* (в 88% случаев) в монварианте (89%) и в ассоциациях с гемолитической *E. coli*. Меньшее количество раз выделялись *Enterobacter* spp. и *Klebsiella* spp. Обследуемые данной возрастной группы имели следующие сопутствующие дисбактериозу диагнозы: недостаточность железа (E 61.6), умеренная БЭН (E 44.0) и диспепсия (K 30). У обследуемых с диспепсией (K 30) в повышенной степени выделялся *S. aureus* (75%) – одиночно (22%) и в ассоциациях с гемолитической *E. coli* (50%) и *Klebsiella* spp. (28%). У всех пациентов с БЭН (E 44.0) наблюдался избыточный рост *S. aureus* – в повышенной степени он высевался одиночно (55%) и в ассоциациях с *Enterobacter* spp. (45%). При анализе кишечного содержимого от обследуемых с недостаточностью железа у большей части пациентов (88%) выделялась гемолитическая *E. coli*.

В III возрастной группе в большем количестве обнаруживались гемолитическая *E. coli* (46%), *Klebsiella* spp. (42%), а также *S. aureus* (31%). Обследуемым из этой возрастной группы были поставлены следующие диагнозы: аллергический и алиментарный гастроэнтерит и колит (K 52.2), диспепсия (K 30), гастродуоденит неуточненный (K 29.9), нарушение всасывания в кишечнике неуточненное (K 90.9). У пациентов с неуточненным гастродуоденитом (K 29.9) чаще в повышенной степени выделялись *S. aureus* (42%) и *Klebsiella* spp. (58%). Они обнаруживались в ассоциациях с *Proteus* spp., гемолитической *E. coli*. У обследуемых с аллергическим и алиментарным гастроэнтеритом и колитом (K 52.2) наблюдался избыточный рост *Klebsiella* spp. (60%) – как в монварианте, так и в ассоциациях

с *Enterobacter* spp. Наиболее часто у обследуемых с нарушением всасывания (К 90.9) наблюдался избыточный рост гемолитической *E. coli* (80%) – в ассоциациях с *S. aureus* и *Klebsiella* spp.

Выводы

У обследуемых I и II групп с высокой частотой высевали *S. aureus*, у III – *Klebsiella* spp. и гемолитическую *E. coli*. Развитие таких патологических состояний, как умеренная БЭН, анемия, диспепсия, хронический поверхностный гастрит, гастродуоденит, аллергический и алиментарный гастроэнтерит и колит может быть обусловлено избыточным ростом грампозитивной (*S. aureus*) и грамотрицательной энтеробактериальной флоры (*Klebsiella* spp., гемолитическая *E. coli*).

Благодарность

Автор выражает благодарность заведующему лаборатории клинической микробиологии ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр» Вологдину Виктору Геннадьевичу за предоставление материала при работе над данной статьей.

Литература

1. Скворцов В.В. Актуальные вопросы диагностики и лечения дисбиоза кишечника / В.В. Скворцов, И.М. Пашенко, Д.А. Меднова // Медицинский совет. – 2015 – № 11. – С. 46–48.
2. Andoh A. Physiological Role of Gut Microbiota for Maintaining Human Health // Digestion. 2016. – Vol. 93. № 3. P. 176–181.
3. Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L., Blumberg R.S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system // Science. 2016. – Vol. 352. № 6285. P. 539–544.
4. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., et al. Role of the normal gut microbiota // World J Gastroenterol. 2015.- Vol. 21. № 29. P. 787–803.
5. LeBlanc J.G., Milani C., de Giori G.S., Sesma F., et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective // Curr Opin Biotechnol. 2013. – Vol. 24. № 2. P. 160–168.

Применение микробных биотестов для оценки изменений токсических эффектов металлов в условиях разных температур совместного действия

Сысолятина М.А., Царева М.С., Олькова А.С.

Вятский Государственный Университет, г. Киров,
fostmarimi@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38301

Биотестирование с использованием тест-организмов обладает рядом преимуществ по сравнению с биотестами на многоклеточных мезо- и микроорганизмах. Микроорганизмы имеют слабые токсикологические барьеры, их жизненный цикл измеряется секундами и минутами, лабораторное культивирование многих микроорганизмов стандартизировано. Эти достоинства привели к появлению и всеобщему признанию микробных биотестов, к которым относятся методики по оценке хемотоксической реакции *Paramecium caudatum* Ehrenberg.

В настоящее время актуальными являются исследования посвященные изучению совместного действия токсических агентов в окружающей среде, поскольку известно, что контаминация элементов и их соединений в компонентах среды и внутренних средах организма приводит к разнообразным по своей силе эффектам синергизма, антагонизма, аддитивного действия (Altenburger et al., 2018). Кроме того, известно, что эффекты потенциально токсичных веществ в естественных экосистемах трансформиру-

ются под влиянием факторов окружающей среды (Olkova, 2021). Одним из таких факторов, всегда имеющего влияние на развитие токсического процесса и итоговые ответные реакции живых организмов, является температура.

Целью данной работы было показать возможности микробных биотестов на *Paramecium caudatum* в комплексной оценке эффектов совместного действия веществ и изменении ответных реакций микроорганизмов в условиях разных температур.

В природную подземную воду вносили соли $\text{La}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, а также эквимольные смеси солей La и Cu (в расчете на ионы металлов). Далее проводили биотестирование модельных растворов, имеющих разные температуры (10 и 25 °C), согласно методике (ПНД Ф Т 14.1:3.4.2-98). На рис. 1 (А и Б) отражены зарегистрированные эффекты.

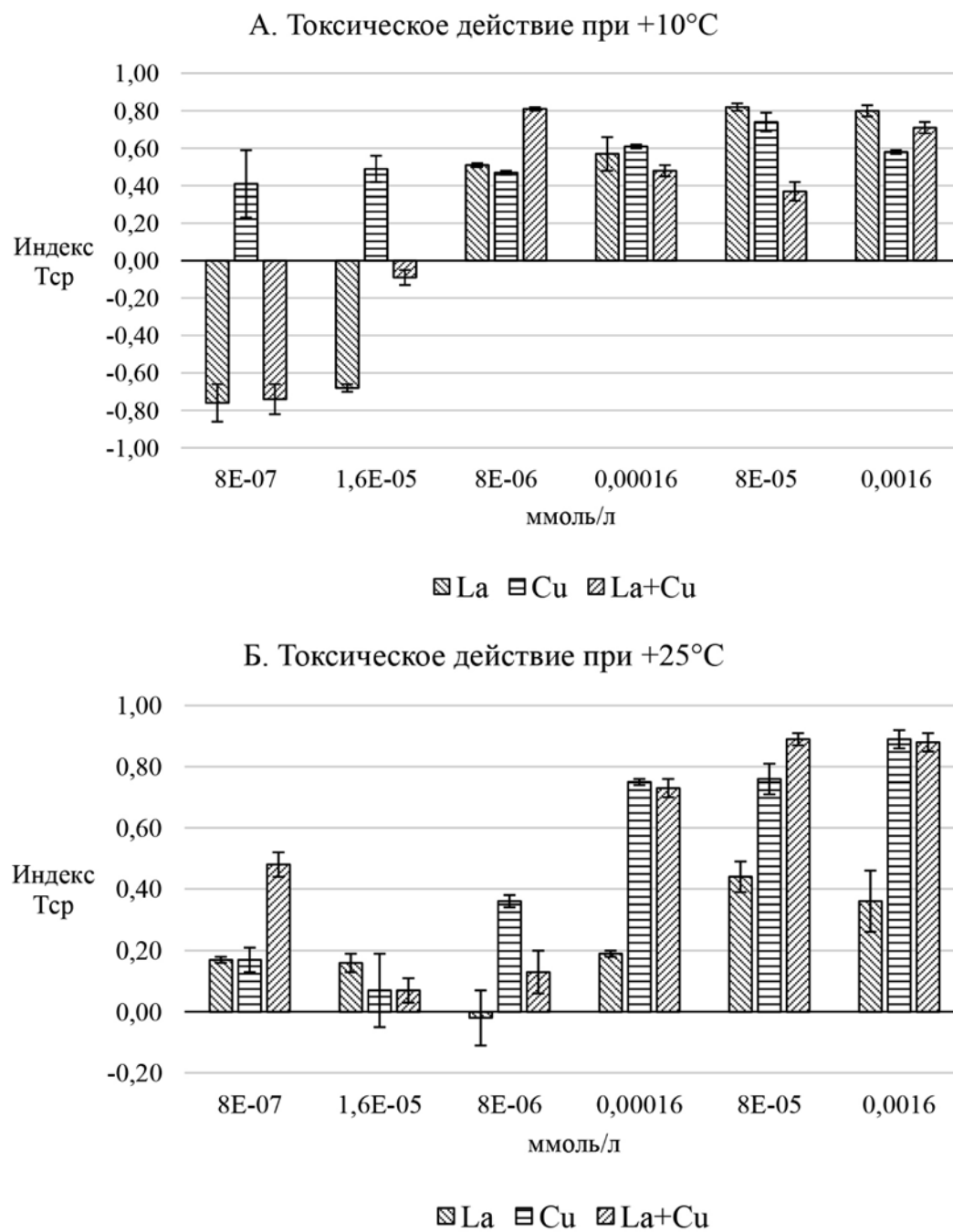


Рис. 1. Изменение хемотаксической реакции *P. caudatum* под воздействием солей La, Cu и их эквимольных смесей. А – температура тестируемой среды 10 °C. Б – температура тестируемой среды 25 °C

При 10 °С наименьшие из тестируемых концентраций лантана и его смеси с медью (0,0000008 и 0,000016 ммоль/л) вызывали стимуляцию хемотаксической реакции инфузорий, что не наблюдалось при действии индивидуальных растворов соли меди. Дальнейшее повышение концентраций эквимолярных растворов привело к увеличению индексов токсичности. Однако строгой зависимости количественных характеристик ответных реакций тест-организмов от возрастающих концентраций зафиксировано не было ($p > 0,05$ в большинстве вариантов).

При повышении температуры до 25 °С действие меди и её смеси с лантаном усилилось. Примечательно, что действие сульфата лантана при пониженной температуре оказалось сильнее, чем при повышенной. Природу этих эффектов еще предстоит изучить.

При 25 °С действие меди и смеси солей меди и лантана в диапазоне концентраций 0,00016–0,0016 ммоль/л было достоверно выше, чем влияние лантана вне смеси ($p < 0,05$). В этом же диапазоне концентраций за счет сравнения эффектов металлов вне смеси и их сочетания показано, что происходит потенцирование действия меди в присутствии лантана. Об этом свидетельствуют одинаковые ($p > 0,05$) ответные реакции *P. caudatum* на растворы с эквимолярными концентрациями меди и смеси солей меди и лантана, в последних из которых наиболее токсичного агента (меди), в количественном выражении присутствовало в 2 раза меньше, чем в «индивидуальных» растворах. Отметим, что при концентрации растворов 0,00008 ммоль/л потенцирование достигает максимума: эффекты смеси солей La и Cu становятся больше, чем действие эквимолярного раствора соли меди. При наименьших тестируемых концентрациях (0,0000008–0,000008 ммоль/л) в некоторых пробах наблюдалась стимуляция тест-функции. В данном диапазоне, предшествующем угнетению, необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, с помощью биотеста по изменению хемотаксиса инфузории *P. caudatum* показано, что:

- повышение температуры усиливает токсические эффекты Cu и смеси Cu + La;
- эффекты лантана при температуре 10 °С оказались значительнее, чем при 25 °С, что является парадоксальным и требующим дальнейшего изучения;
- лантан потенцирует действие меди, что достоверно показано в диапазоне эквимолярных концентраций металлов и их смесей 0,00016–0,0016 ммоль/л, и наиболее заметно при температуре 25 °С.

Следовательно, микробные биотесты удобны для изучения эффектов совместного действия веществ, трансформации этих эффектов под влиянием температурного фактора, что приближает лабораторные оценки токсичности к реальным ситуациям в природных экосистемах.

Литература

1. Altenburger R., Scholze M., Busch W., Escher B., Jakobs G., Krauss M., Krueger J., Neil P., Ait-Aissa S., Almeida A.C., Seiler T.B., Brion F., Hilscherova K., Hollert H., Novak J., Schlichting R., Serra H., Shao Y., Tyndall A., Tolefsen K.E., Umbuzeiro G., Williams T.D., Kortenkamp A. Mixture effects in samples of multiple contaminants—an inter-laboratory study with manifold bioassays // Environment International. – 2018. – Т. 114. – С. 95–106. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1016/j.envint.2018.02.013>
2. Olkova A. Intraspecific Sensitivity to Toxicants—a Methodological Problem of Bioassay // Journal of Ecological Engineering. – 2021. – Т. 22. – № 7. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.12911/22998993/139066>
3. Методика определения токсичности проб питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных вод экспресс методом с применением прибора «Биотестер» ПНД Ф Т 14.1:3:4.2-98 (ред. 2010 г.).

Приготовление и исследование крема, обогащенного пробиотическими лактобактериями

Устюжанинова Л.В.¹, Надолинская А.А.²

¹ Вятский государственный университет, г. Киров,
старший преподаватель кафедры микробиологии,
lv_ustyuzhaninova@vyatsu.ru

² Вятский государственный университет, г. Киров,
студент группы Бб-3102-01-00, nolinskaa@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38302

Молочнокислые микроорганизмы уже давно используются при консервировании пищевых продуктов. А так как в последние годы наблюдается тренд на «натуральную» косметику, свободную от искусственных консервантов, отдушек и тому подобных добавок, то стоит рассмотреть пробиотические лактобактерии, обладающие высокой антагонистической активностью, как консервирующие компоненты косметических средств. Также лактобактерии являются важной составляющей нормальной микрофлоры урогенитального тракта [1, 2]. Поэтому целесообразно обогащать средства интимной гигиены пробиотическими лактобактериями, которые будут оказывать благотворный профилактический эффект на интимную зону. Поэтому предлагается использовать пробиотические лактобактерии в составе косметических средств в двух направлениях: как натуральный консервант и как пробиотик в средствах для интимной гигиены.

Разрабатываемые рецептуры и технология приготовления косметических средств будут интересны компаниям, занимающимся производством парфюмерно-косметической продукции, так как это позволит им расширить ассортимент выпускаемой продукции вариантами с особо полезными свойствами и/или более натуральным составом, что, в свою очередь, соответствует последним тенденциям в сфере потребления косметической продукции и средств гигиены. Сами предлагаемые косметические средства будут интересны людям, стремящимся к осознанному потреблению, предпочитающим натуральный состав, желающим иметь средства ухода с профилактическими полезными свойствами.

Цель работы

Целью данной работы было оценить возможность обогащения уже имеющихся средств интимной гигиены пробиотическими лактобактериями без изменения их рецептуры. Такой вариант был бы максимально удобен производителям этих средств.

Задачи:

- получить инокулят лактобактерий;
- выбрать образцы ПКС для исследования и проверить их на микробиологическую чистоту;
- инокулировать выбранные образцы ПКС лактобактериями и определять концентрацию живых бактерий в них каждую неделю;
- проанализировать результаты.

Методическая часть

Объект исследования – пробиотические лактобактерии *Lactobacillus plantarum* 8p-A3.

В качестве образцов для инокуляции лактобактериями были выбраны следующие варианты (без указания производителей):

Образец 1 – интимная гель-смазка;

Образец 2 – детский крем;

Образец 3 – мыло для интимной гигиены.

Микробиологическую чистоту образцов ПКС определяли согласно рекомендациям ТР ТС 009/2011 по МУК 4.2.801-99 [3-4].

Результаты микробиологического исследования образцов косметической продукции перед инокуляцией лактобактериями показали, что образцы соответствуют требованиям Таможенного союза о безопасности парфюмерно-косметической продукции [4]: во всех образцах в 1 г не обнаружены бактерии *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*; содержание МАФАНМ, дрожжевых и плесневых грибов составило менее 5 КОЕ/г для образцов 2 и 3, для образца 1 – 100 и 50 КОЕ/г соответственно.

Лактобактерии выращивали на бульоне MRS при 37 °С в течение 20–24 часов, центрифугировали 10 минут при 3500 оборотах/мин. Потом фугат сливали так, чтобы лактобактерии остались на дне пробирки, осадок ресуспендировали с получением суспензии. Все косметические средства инокулировали суспензией лактобактерий с концентрацией $3,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в количестве 0,2 мл/г ПКС. Далее исследовали выживаемость лактобактерий в данных образцах во время хранения при комнатной температуре.

Таблица 1

**Изменение концентрации лактобактерий
в исследуемых образцах, КОЕ/г**

Номер образца	Время хранения, нед.		
	0	1	2
1		Менее 100	Менее 50
2	$(7,1 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$(4,1 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(4,1 \pm 0,3) \cdot 10^4$
3		$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^2$

При сравнении выживаемости лактобактерий в составе косметических средств через неделю было выявлено, что в образце № 1 их не было обнаружено при высеве, в образце № 2 количество лактобактерий сократилось на два порядка, а в образце № 3 – на три порядка. За вторую неделю хранения концентрация лактобактерий ещё снизилась: в 10 раз в образце № 2 и в 100 раз в образце № 3. Наименьшая скорость отмирания лактобактерий (и более высокая их концентрация) наблюдались в образце детского крема (№ 2), что связано с его более мягким натуральным составом. Необходимо продолжить исследования, чтобы проверить возможность повышения выживаемости лактобактерий в образцах ПКС.

Литература

1. Беликов О.Е., Пучкова Т.В. Консерванты в косметике и средствах гигиены. М., 2003. 204 с.
2. Зюбр Т.П., Мурашкина И.А., Васильев И.Б. Препараты нормофлоры: учеб. метод. пособие: 31.10.2008. Иркутск, 2008. 59 с.
3. МУК 4.2.801-99. Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции: принят 27.12.1999; действ. с 27.12.1999. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200029647>.
4. ТР ТС 009/2011. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности парфюмерно-косметической продукции: принят 23.09.2011; действ. с 01.07.2012. URL: ТР ТС 009/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности парфюмерно-косметической продукции».

Микробное разнообразие родниковой воды Травертинового источника на территории памятника природы регионального значения в г. Ставрополе

Харина Е.И., Гасюкова М.В.

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
(Медико-биологический факультет, базовая кафедра микробиологии)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38303

В настоящее время наблюдается активное использование населением г. Ставрополя воды из Травертинового источника в питьевых целях. Он является памятником природы регионального значения и находится на особо охраняемой природной территории в государственном природном заказнике краевого значения «Русский лес» (основан 04.01.1978) [4], и поэтому вода там считается заведомо чистой. Однако статус охраняемой территории не всегда позволяет утверждать о безопасности употребления воды такого источника.

Важно отметить, что помимо тяжелых металлов, аммиака, нитратов, нитритов и вредных органических веществ, поступающих в почву в результате жизнедеятельности человека, через воду также могут передаваться и различные кишечные инфекции, среди них: сальмонеллез, холера, брюшной тиф и паратифы, дизентерия, полиомиелит, а также лептоспирозы, сибирская язва, туберкулез, туляремия, большое количество грибковых заболеваний и т.д.

В связи с этим необходим регулярный контроль санитарно-микробиологического состояния природных вод, который позволит определить наличие в воде патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также предотвратить распространение инфекционных заболеваний среди населения.

Цель данного исследования – изучение микробного разнообразия родниковой воды Травертинового источника на территории памятника природы регионального значения в г. Ставрополе.

При исследовании микрофлоры родниковой воды была использована методика МУК 4.2.1018-01 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды». Исследовались такие показатели как: общее микробное число (ОМЧ), общие колиформные бактерии (ОКБ), термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ), споры сульфид-редуцирующих клостридий. Отбор проб производили согласно ГОСТу 319422012 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа» в октябре 2021 г. и 2022 г. Бактериологическое исследование и обработка полученных результатов проводилось в лаборатории микробиологии на базовой кафедре микробиологии Северо-Кавказского федерального университета.

Таблица

Анализ микробиологических показателей родниковой воды Травертинового источника (октябрь 2021, 2022 гг.)

Показатели	Допустимые значения (СанПиН 2.1.4.1074-01)	Октябрь 2021 г.	Октябрь 2022 г.
ОМЧ	Не более 50 КОЕ/мл.	10 КОЕ/мл.	39 КОЕ/мл.
ОКБ	н/н	н/н	н/н
ТКБ	н/н	н/н	н/н
ССК	н/н	н/н	н/н

Полученные результаты исследования не превышали допустимых значений микробиологических показателей действующего норматива СанПиН 2.1.4.1074-01 для питьевой воды и в 2021 и 2022 гг. (таблица). Общие колиформные бактерии, термотолерантные колиформные бактерии и споры сульфид-редуцирующих клостридий обнаружены не были ни в одном из образцов. Отмечено увеличение такого

показателя, как общее микробное число в 2022 году на 29 КОЕ, что можно объяснить повышением среднемесячной температуры в 2022 г.

Микроскопирование образцов, полученных в октябре 2021 и 2022 г., позволяет утверждать, что микрофлора воды исследованного родника монотипная, преобладают грамотрицательные палочки, расположены поодиночке или парами, длина от 0,5 до 1–2 мкм. В меньшем количестве были обнаружены крупные овальные клетки размером 3–5 мкм, единично встречаются коковые формы.

Таким образом, результаты исследования показали, что микрофлора природных вод Травертинового источника содержит небольшое количество и скудное разнообразие микроорганизмов, что свидетельствует о невысокой степени бактериального загрязнения вод и санитарно-микробиологического благополучия данного источника. Однако, при употреблении такой воды необходим ее систематический контроль для предотвращения возможности распространения инфекционных заболеваний среди населения.

Литература

1. ГОСТ 319422012 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа».
2. Кузеванов К.И. Химический и микробиологический состав ручьев городской территории г. Томска / К.И. Кузеванов, Е.М. Дутова, Н.Г. Наливайко, Д.С. Покровский // Известия ТПУ, 2005, т. 308, № 2. – С. 48-54.
3. МУК 4.2.1018-01 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».
4. <https://mpr26.ru/oopt/pamyatniki-prirody/travertinovyy-istochnik/> (дата обращения: 16.10.2022).

Сообщества актинобактерий рода *Micromonospora* в городских почвах Ростова-на-Дону

Чайкина А.П., Горовцов А.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону,
Chaykina@sfedu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38304

Актинобактерии играют важную роль в почвенных экосистемах, выполняя в них целый спектр функций от синтеза гуминовых веществ до деструкции сложных субстратов. Обилие актинобактерий в почве очень высоко, а сам актиномицетный комплекс включает большое количество родов. Однако, большинство исследований актинобактерий посвящено мажорному роду *Streptomyces*. Род *Micromonospora*, относящийся к редким родам актиномицетов, всё еще остается относительно малоизученным, несмотря на ряд биохимических и физиологических свойств (способность к синтезу антибиотиков, устойчивость к антропогенным загрязнителям, стимуляция роста растений и другие), которые делают данный род биотехнологически и экологически перспективным. В данном исследовании впервые приводится характеристика сообществ актинобактерий рода *Micromonospora* и определяется круг видов, которые могут встречаться в городских почвах города Ростова-на-Дону.

Селективное выделение микромоноспор производили методом изоляции редких родов актиномицетов (Nayakawa et al., 1991; Nayakawa, Nonomura, 1987). Пробы почв отбирались летом и осенью в точках города, отличающихся по уровню антропогенной нагрузки. Все точки города были сгруппированы по степени антропогенной нагрузки и давности вовлечения в процесс урбанизации в три группы: центральные, селитебные и минимально нарушенные зоны. Почвы центральных точек являлись наиболее антропогенно-преобразованными, почвы селитебной зоны характеризовались средним уровнем антропогенной нагрузки, в группу минимально нарушенных были отнесены точки, находящиеся в рекреационных зонах города, а также в новых окраинных районах города, где почвы по характеристикам близки к естественным.

Идентификация видов производилась биохимическими и культуральными методами. Определялись цвет субстратного мицелия и диффундирующего пигмента выделенных изолятов на ряде дифференциально-диагностических сред (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7). Также определялся паттерн утилизации источников углерода каждым изолятом. Заранее приготавливался аналог плотной питательной среды с замещением агар-агара на бентонит, чтобы исключить возможность утилизации полисахаридов самого агар-агара из среды в качестве источника углерода. Бентонитовый гель замешивали на основе сухого минерального порошка добавлением жидкой среды Придхэма-Готтлиба. На каждую чашку петри помещали комочки бентонитового геля, которые служили твердой фазой для питательной среды, в количестве, соответствующем количеству исследуемых углеводов. На каждый комочек добавляли растворы каждого из исследуемых 17 сахаров и сахароспиртов, а затем инокулировали суспензией спор каждого выделенного изолята микромоноспор. Способность к утилизации каждым штаммом определяли по наличию роста колоний.

Численность микромоноспор значительно различалась между группами точек и практически во всех случаях достоверно не отличалась на площадках внутри каждой группы; сезонной динамики выявлено не было.

Таблица 1

Диапазоны численности микромоноспор по группам площадок

Группа площадок	Диапазон численности летом, тыс. КОЕ/г	Численность осенью, тыс. КОЕ/г
Центральные	201,11–379,49	304,80–484,30
Селитебные	117,74–285,71	163,72–308,96
Минимально нарушенные	51,52–96,38	73,66–168,34

Численность микромоноспор была максимальной в центральных точках, средние значения наблюдались в селитебных зонах, наименьшие значения наблюдались в минимально нарушенных зонах. Такая динамика численности может быть связана с высокой устойчивостью микромоноспор к антропогенным загрязнителям, в том числе к тяжелым металлам. При анализе по методу главных компонент была выявлена положительная связь численности микромоноспор с содержанием тяжелых металлов (Pb, Co, Zn) в почве.

Из почв города Ростов-на-Дону были выделены 5 штаммов актинобактерий, принадлежащих к роду *Micromonospora*. Сопоставив морфологические характеристики роста каждого из штаммов на дифференциально-диагностических средах и данные о паттернах утилизации углеводов разными видами рода *Micromonospora* (Ludwig et al., 2012), установили наиболее близкие виды, к которым могут принадлежать выделенные изоляты: *Micromonospora inositola*, *Micromonospora siamensis*, *Micromonospora nigra*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora carbonacea*, *Micromonospora mirobrigensis*.

Литература

1. Hayakawa M. и др. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil // J Ferment Bioeng. 1991. Т. 72. № 5.
2. Hayakawa M., Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes // Journal of Fermentation Technology. 1987. Т. 65. № 5.
3. Ludwig W., Euzeby J., Schumann P., Busse H.-Y., Trujillo M.E., Kampf P., Whitman W.B. Road map of the phylum Actinobacteria Bergey's manual® of systematic bacteriology. 2 ed. New York, NY: Springer, 2012. 2083 p.

БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ; ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Совместное применение бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков против штаммов *Staphylococcus aureus* с множественной лекарственной устойчивостью

Абдраймова Н.К., Корниенко М.А., Беспятых Д.А., Городничев Р.Б., Шитиков Е.А.

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического агентства»,
abdraimovanarina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38305

Распространение штаммов *Staphylococcus aureus* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) является актуальной проблемой современной медицины. В связи с чем необходимо осуществлять поиск альтернативных вариантов терапии инфекционных заболеваний, вызванных патогеном. Одним из таких вариантов является совместное использование антибиотиков различных классов с литическими (вирулентными) бактериофагами [1].

Целью настоящей работы была оценка результата комбинированного воздействия литического бактериофага vB_SauM-515A1 семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические штаммы *S. aureus*.

В работе были использованы клинические изоляты *S. aureus* ($n = 4$), ранее описанный литический бактериофаг vB_SauM-515A1 [2] и антибиотики различных классов (оксациллин, ванкомицин, гентамицин, тетрациклин, левофлоксацин, линезолид). Характеристику штаммов проводили при помощи метода мультилокусного секвенирования-типирования. Профиль лекарственной чувствительности определяли на основании стандартов CLSI. Для оценки эффективности лизиса бактерий под действием бактериофагов были построены кривые роста штаммов, инфицированных бактериофагом при различных значениях МОИ (множественность инфекции). Эффективность совместного воздействия антибиотика (1/8, 1/4, 1/2 МИК) и бактериофага (0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 МОИ) оценивали при сравнении значений оптических плотностей опытных и контрольных образцов после 24 часов инкубации.

Исследуемые штаммы характеризовались МЛУ и относились к клинически значимым сиквенс-типам: ST1, ST8 и ST121. Оптимальные значения МОИ, наиболее интересные для исследования комбинированного воздействия, составили: 0,001 МОИ для штаммов SA515/1 и SA413; 0,01 и 0,001 МОИ для штамма SA1050; 0,0001 и 0,00001 МОИ для штамма SA64. Совместное использование литического бактериофага vB_SauM-515A1 с оксациллином, тетрациклином и линезолидом приводило к взаимодополняющему

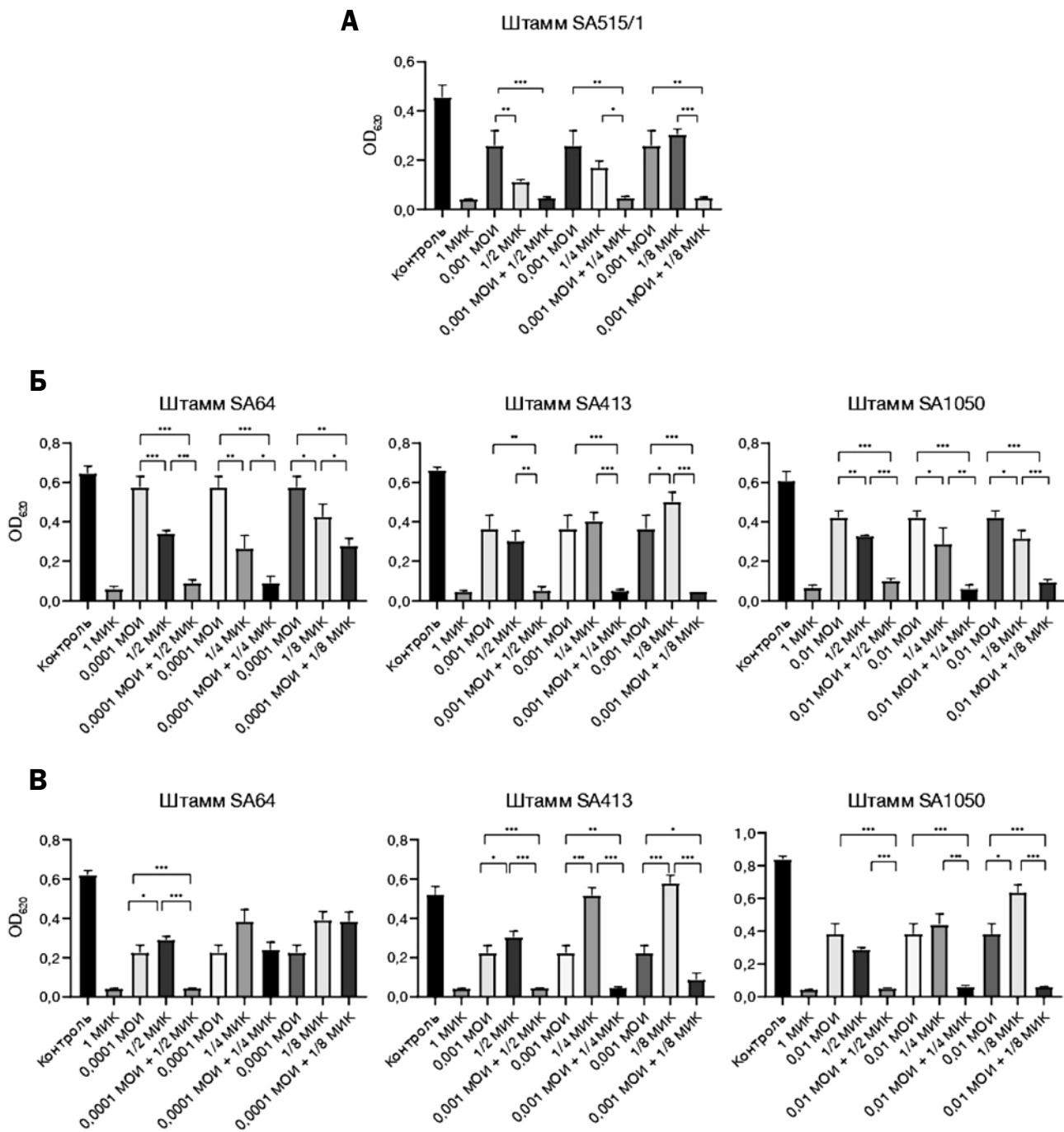


Рис. 1. Комбинированное воздействие литического бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков (оксациллина (А), тетрациклина (Б), линезолида (В)) на штаммы *S. aureus* при оптимальных значениях МОИ. Статистическую значимость обозначалась следующим образом: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$

эффекту, по сравнению с индивидуальным использованием каждого из агентов (рис. 1). В большинстве случаев подобный эффект наблюдался в экспериментах при оптимальных значениях МОИ. Важно отметить, что снижение эффективности действия одного антибактериального агента (антибиотик/бактериофаг) в присутствии другого во всех исследуемых комбинациях не наблюдалось.

Согласно полученным результатам, вирулентный бактериофаг vB_SauM-515A1 может быть рассмотрен в качестве вспомогательного терапевтического агента против штаммов *S. aureus* с МЛУ.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Литература

1. Simon K. et al. Synergy between Phage Sb-1 and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel). 2021 Jul 13;10(7):849.
2. Kornienko M. et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. Sci Rep. 2020 Oct 29; 10(1): 18612.

Характеристика Fur-зависимых некодирующих РНК у *Pseudomonas putida* BS3701

Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
tanechka2576@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38306

Железо является необходимым элементом для многих живых организмов. Оно входит в состав различных белков в виде железо-серного кластера (например, сукцинатдегидрогеназа, ферредоксины) или гема (цитохромы). Так как в аэробных условиях железо находится в виде нерастворимого иона Fe^{3+} , бактериям необходимы особые системы его захвата. Однако высокая концентрация железа в клетке может спровоцировать реакцию Фентона, в результате которой образуются активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс. Поэтому бактериальным клеткам необходимо регулировать концентрацию ионов Fe^{2+} .

Белок Fur является глобальным металл-зависимым транскрипционным регулятором, позволяющим поддерживать гомеостаз железа у бактерий. Fur связывается с ДНК в виде димера, в каждом мономере которого содержится ион Fe^{2+} , и подавляет экспрессию генов, продукты которых входят в систему захвата железа (например, сидерофоры). В условиях дефицита белок теряет ион и перестает быть связанным с ДНК. Однако регуляция осуществляется не только за счет прямого связывания Fur с промоторной областью подконтрольных генов, но и опосредованно через малые некодирующие РНК (нкРНК) PrrF. Предположительно, данные нкРНК связываются с мРНК целевых генов и привлекают РНКазу.

PrrF хорошо изучены у *Pseudomonas aeruginosa*, однако есть и у других видов. В геноме синегнойной палочки prrF расположены тандемно, а их идентичность составляет 90%. Внутри генома других видов псевдомонад эти гены локализованы отдельно друг от друга, однако степень их сходства выше 80%. Целью данной работы было охарактеризовать 2 гена prrF в *Pseudomonas putida* BS3701.

P. putida BS3701 содержит 2 prrF, расположенных на значительном расстоянии друг от друга. Для характеристики их локусов был использован сервис Syntax. Обнаружено, что локус одной из prrF является универсальным не только у большинства представителей вида, но и среди других видов псевдомонад (*aeruginosa*, *syringae*, *fluorescens*, *stutzeri*). Вторая нкРНК находится среди генов бактериофага, данная локализация гена не характерна для других псевдомонад.

Для определения сайта связывания Fur перед генами prrF *P. putida* BS3701 их последовательности были выровнены на известные Fur-box *P. aeruginosa* PAO1 с помощью алгоритма ClustalW. Область промотора (-10 и -35) была предсказана с помощью онлайн-сервиса Softberry. Оказалось, что сайт связывания Fur находится внутри промоторной области, которая ранее была ошибочно включена в состав гена. Биоинформатическое сравнение регуляторных областей двух нкРНК не позволяет однозначно установить преимущество экспрессии одной из них.

Чтобы найти консервативные участки генов prrF *P. putida* BS3701 они были выровнены с помощью алгоритма ClustalW с другими prrF разных видов псевдомонад. Каждая нкРНК содержит Rho-независимый терминатор. RNAfold предсказал у PrrF наличие 4-х шпилек: последовательность UCGCGAG, кото-

рая консервативна у всех исследованных PrtF, предположительно является петлей шпильки 2 (функция неизвестна), последовательность UAUCUCCUCAUCAGGCUAAU входит в состав короткого участка стебля шпильки 3 и формирует шпильку 4 (часть нуклеотидов ответственная за связывание с РНК-шапероном Hfq, функция других неизвестна).

Учитывая высокую идентичность между двумя prtF (94%) была выдвинута гипотеза, что разница в их работе в клетке может возникать из-за разного сродства регулятора Fur к сайту связывания, что позволяет нкРНК экспрессироваться в зависимости от концентрации железа, или в их нацеленности на мРНК разных генов.

Calcium Regulating hormones

Ali Adeeb Hussein Ali

Yanka Kupala State University of Grodno, YKSUG, Grodno, Republic of Belarus,
medic_lab2015@yahoo.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38307

Vitamin D is classified on the basis of an essential hormone and has a very important physiological function represented in maintaining the level of calcium within the cell and thus maintaining metabolic functions. Some other hormones, such as the parathyroid hormone, play in conjunction with vitamin D (in the form of calcitriol) in regulating the metabolism of calcium.

Deficiency of vitamin D is a worldwide issue for public health. Around 1 billion individuals are vitamin D deficient. The potential of either the skin to produce vitamin D₃ is lowered by more than twice in individuals over the age of 70 [1].

Vitamin D is a class of fat-soluble secosteroids that increase in the gastrointestinal absorption of some elements like Ca, Mg, Fe, P, and Zn. The Vitamin D subgroup has nearly 30 compounds, however the two most essential types are vitamin D₂ and vitamin D₃.

Vitamin D₂ and D₃ (ergocalciferol and cholecalciferol) are found in plants and animals, respectively. Fish provides vitamin D₂ and D₃ through the diet. Vitamin D₂ may be generated synthetically, but vitamin D₃ is produced in the human skin from 7-dehydrocholesterol following sunlight exposure [2].

7-dehydrocholesterol throughout the skin absorbs solar Ultraviolet rays and is transformed into Pre-Vitamin D₃ when exposed to sunshine. 7-dehydrocholesterol is transformed to cholesterol, eliminating a precursor of 25-hydroxyvitamin D₃ from the vitamin D₃ synthesis pathway.

Calcitriol is essential (advance) structure of the vitamin D that is generally produced in the kidney. It is a hormone that the vitamin D receptor in the cell's nucleus, increasing the expression of several genes. 1,25-dihydroxycholecalciferol is another name for it. 1,25-dihydroxycholecalciferol, or 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, is produced in the body after series of conversion steps of 7-dehydrocholesterol [3]. Calcitriol synthesis in the kidneys is induced by parathyroid glands, low calcium, and low phosphate levels. Calcitriol functions with parathyroid hormone to regulate blood calcium levels by increasing gastrointestinal calcium and phosphate absorption, increasing renal tubular reabsorption of calcium, and activating the release of calcium deposits from the bones. Calcitriol raises blood calcium (Ca²⁺) primarily via increasing calcium intake from the intestines. There is ample proof that calcitriol influences cytokine activity and it may affect immunological and pathological responses, cell turnover, and cell differentiation.

In every way, calcitriol is a hormone that is created by a complicated set of enzymatic processes, including the plasma transport of precursor molecules to a variety of organs. Calcitriol, the active molecule, is carried to other organs where it stimulates biological processes in a way similar to that of steroid hormones.

The effects of vitamin D metabolites include:

- stimulation of osteoclastic bone resorption and osteocytic osteolysis,
- increased differentiation of cells – precursors of osteoclasts,

- increased calcium reabsorption in the distal renal tubules,
- increase in the pool of calcium in the body.

According to much scientific research conducted by scientists, this has led to changing ideas about vitamin D, developing ideas about metabolic pathways and postulating new mechanisms since it has been shown that active vitamin D receptors have a clear effect on physiological processes [4]. It has been proven that vitamin D deficiency leads to an increased risk of many diseases, and therefore, vitamin D has gone beyond the limits of calcium metabolism and has become an essential factor for ensuring physiological functions within the human body.

REFERENCES

1. Nair R., Maseeh A. Vitamin D: The “sunshine” vitamin // J. Pharmacol. Pharmacother. – SAGE Publications Sage India: New Delhi, India, 2012. – Vol. 3, № 2. P. 118–126.
2. Holick M.F., Dawson-Hughes B. Nutrition and bone health. – Springer, 2004. – 403–440 p.
3. Dereje S., Muradov I., Nazzal S., Nguyen T. Cholecalciferol (D3) versus ergocalciferol (D2) in older adults // Consult. Pharm. – American Society of Consultant Pharmacists, 2017. – Vol. 32, № 6. – P. 337–339.
4. Goltzman D., Mannstadt M., Marcocci C. Physiology of the calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis // Vitam. D Clin. Med. – Karger Publishers, 2018. – Vol. 50. – P. 1–13.

Морфологическая пластичность и состав мембранных липидов штамма *Phaeotremella foliacea* LE-BIN 4616

Амигуд Е.Я.¹, Кияшко А.А.², Серебряков Е.Б.³, Сеник С.В.²

¹ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, ekamigud@gmail.com

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

³ Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» СПбГУ, Санкт-Петербург

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38308

Phaeotremella foliacea (Pers.) Wedin, J.C. Zamora & Millanes – базидиальный гриб (Tremellomycetes, Phaeotremellaceae), паразитирующий на мицелии дереворазрушающего гриба *Stereum sanguinolentum* и способный к мицелиально-дрожжевому диморфизму. Произрастает в зонах с умеренным климатом, преимущественно в Северном полушарии. Плодовое тело желеобразное, листоватое, коричневого цвета, без ножки.

Чистая культура *P. foliacea* была выделена из плодового тела, собранного в Саяно-Шушенском государственном природном биосферном заповеднике Красноярского края на валежном стволе ели. Таксономическая верификация штамма была проведена с помощью секвенирования последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) ядерной рибосомной ДНК. Штамм LE-BIN 4616 подерживается в коллекции методом субкультуры на агаризованной среде на основе пивного суслу.

Изучена морфологическая пластичность культуры *P. foliacea* в зависимости от условий культивирования – состава среды и облучения ультрафиолетом. Штамм выращивали на полной питательной среде на основе пивного суслу без или с добавлением дрожжевого экстракта, полу-синтетической среде с пептоном, среде Чапека с глюкозой 20 г/л и без глюкозы, средах с разными источниками азота – (NH₄)₂NO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃ – и с дефицитом фосфора. Во всех условиях культура состояла преимущественно из монополярно почкующихся дрожжевидных клеток, в зависимости от состава среды варьировал их размер, в некоторых случаях присутствовали вздутые и прорастающие дрожжевидные клетки. Наиболее заметное воздействие на морфологию культуры имело облучение УФ, вызвавшее резкое уменьшение среднего размеров клеток. Дефицит фосфора привёл к неожиданному увеличению скорости роста культуры *P. foliacea*, в результате чего наблюдались более крупные по сравнению с полной питательной средой колонии.

Анализ мембранных липидов методом тонкослойной хроматографии показал, что дефицит фосфора вызвал значительную перестройку метаболизма липидов – произошло существенное снижение уровня фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, увеличение уровня фосфатидной кислоты и индукция биосинтеза бетаинового липида диацилглицеринтриметилгомосерина (ДГТС), отсутствовавшего в липидном профиле *P. foliacea* на полной питательной среде. Методами липидомики (HPLC-MS) получены данные о составе молекулярных видов фосфо- и бетаиновых липидов. Бетаиновые липиды представляют собой бесфосфорные глицеролипиды, содержащие триметиламмонийную группу в полярной части молекулы. Они широко распространены среди некоторых простейших, фотосинтезирующих бактерий и водорослей, грибов и споровых растений. Полагают, что ДГТС является эволюционным предшественником основного мембранного липида ФХ (Dembitsky, 1996). Являясь структурными аналогами ФХ, бетаиновые липиды, тем не менее, не имеют остатка фосфорной кислоты. Эта особенность позволяет клетке экономить фосфор при синтезе мембранных липидов. Случаи компенсаторного замещения фосфолипидов бесфосфорными бетаиновыми в условиях дефицита фосфора описаны у бактерий *Rhodobacter sphaeroides* (Benning et al., 1995) и *Sinorhizobium meliloti* (Geiger et al., 1999) и некоторых грибов (Riekhof et al., 2014; Senik et al., 2015).

Таким образом, была обнаружена способность штамма *P. foliacea* LE-BIN 4616 индуцировать синтез бетаинового липида ДГТС при культивировании на среде с дефицитом фосфора.

Исследование проводилось с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества» при поддержке гранта РФФИ № 20-04-01092.

Литература

1. Benning C., Huang Z.H., Gage D.A., 1995. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. Arch. Biochem. Biophys. 317, 103–111.
2. Dembitsky V.M., Rozentsvet O.A. Distribution of polar lipids in some marine, brackish and fresh water green macrophytes. Phytochemistry. 1996. V. 41, № 2. P. 483–488.
3. Geiger O., Röhrs V., Weissenmayer B., Finan T.M., Thomas-Oates J.E., 1999. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. Mol. Microbiol. 32, 63–73.
4. Riekhof W.R., Naik S., Bertrand H., Benning C., Voelker D.R., 2014. Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus free betaine-lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine. Eukaryot. Cell 13 (6), 749–757.
5. Senik S.V., Maloshenok L.G., Kotlova E.R., Shavarda A.L., Moiseenko K.V., Bruskin S.A., Koroleva O.V., Psurtseva N.V. Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. Phytochemistry. 2015. V. 117. P. 34–42.

Механизм антимикробного действия L-лизин α -оксидазы из гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D

Аринбасарова А.Ю.¹, Лукашева Е.В.², Бабаева Г.², Меденцев А.Г.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
aarin@rambler.ru

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38309

Почвенные грибы *Trichoderma* синтезируют множество соединений, выполняющих защитную функцию и участвующих в формировании микробиоценоза почвы, среди которых – низкомолекулярные вторичные метаболиты с антибиотическими свойствами, литические ферменты, разрушающие клеточные

стенки грибов и бактерий и др. [1]. Кроме указанных метаболитов грибы *Trichoderma* способны синтезировать внеклеточную L-лизин α -оксидазу (ЛО) (1.4.3.14) [2, 3]. Этот фермент является предметом интенсивного изучения благодаря потенциалу его использования в биотехнологии и медицине.

В настоящей работе показано антимикробное действие ЛО и изучен его механизм, что позволяет охарактеризовать вероятную функциональную роль ЛО для продуцента в природных условиях. До настоящего времени изучение антимикробной активности оксидаз аминокислот продолжает быть актуальным в связи с полифункциональностью этих ферментов, а также в связи с многообразием механизмов антимикробного действия.

Изучение антимикробного действия проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ, а также методическим рекомендациям института клинических и лабораторных стандартов. Испытания проводили на жидких и агаризованных питательных средах.

Показано, что рост всех тестируемых аэробных бактерий – *Bacillus subtilis* VKM В-720, *Enterococcus durans* VKM В-603, *Staphylococcus epidermidis* GISK 33 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureofaciens* VKM В-1249 – полностью подавлялся препаратом ЛО, причем антимикробный эффект проявлялся как против грамположительных, так и против грамотрицательных микроорганизмов. Рост анаэробной бактерии *Clostridium. sporogenes* в присутствии ЛО не тормозился. Кроме того, в присутствии ЛО отмечалось торможение роста фитопатогенных грибов: *Fusarium decemcellulare* VKM F-1179, *Rhizoctonia solani* VKM F-895 и *Aspergillus niger* VKM F-1119.

На рис. 1 в качестве примера показано ингибирование роста грамположительных бактерий *E. durans* VKM В-603 (кат-) и *E. durans* VKM В-603 (кат-) и *B. subtilis* VKM В 720 (кат+) под действием ЛО в различной концентрации.

Антимикробное действие показано для оксидаз L-аминокислот из различных источников: животных клеток, грибов и бактерий. Обнаружено также, что действующим началом может являться пероксид водорода, образующийся при расщеплении соответствующего субстрата [2]. Существуют и другие механизмы антимикробного действия оксидаз аминокислот, не связанные непосредственно с образованием активных форм кислорода в окружающей среде, а обусловленные взаимодействием оксидаз с клеточной стенкой и последующей программируемой гибелью клетки [4].

Для выяснения вопроса о возможном механизме действия ЛО на микроорганизмы исследовали действие ЛО в присутствии и отсутствии каталазы при культивировании тестовых микроорганизмов на агаризованной питательной среде (рис. 2). Во всех указанных случаях добавление каталазы не снимало полностью антимикробного эффекта ЛО.

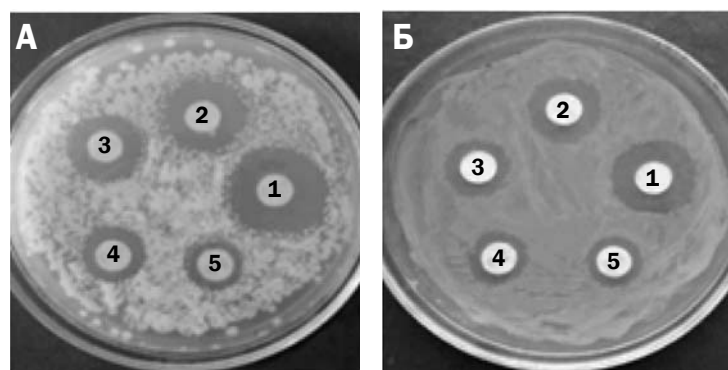


Рис. 1. Влияние ЛО на рост бактерий *E. durans* VKM В-603 (А) и *B. subtilis* VKM В-720 (Б).
1 – 5 Е/мл; 2 – 1 Е/мл; 3 – 0,5 Е/мл; 4 – 0,2 Е/мл;
5 – 0,1 Е/мл

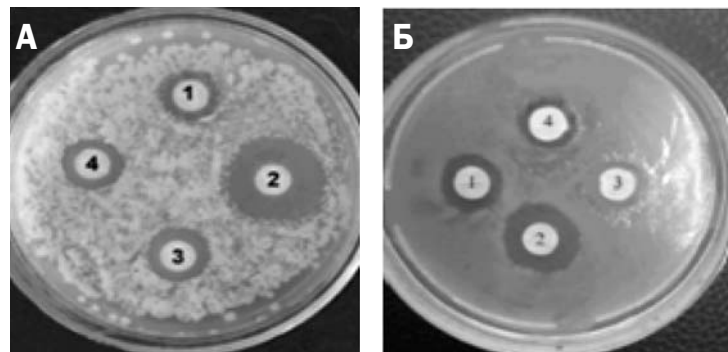


Рис. 2. Влияние каталазы на антибактериальную активность ЛО: А – *E. durans* VKM В-603; Б – *P. aureofaciens* VKM В-1249.
1 – ЛО (1 Е); 2 – ЛО + L-лизин; 3 – ЛО + L-лизин + каталаза; 4 – ЛО + каталаза

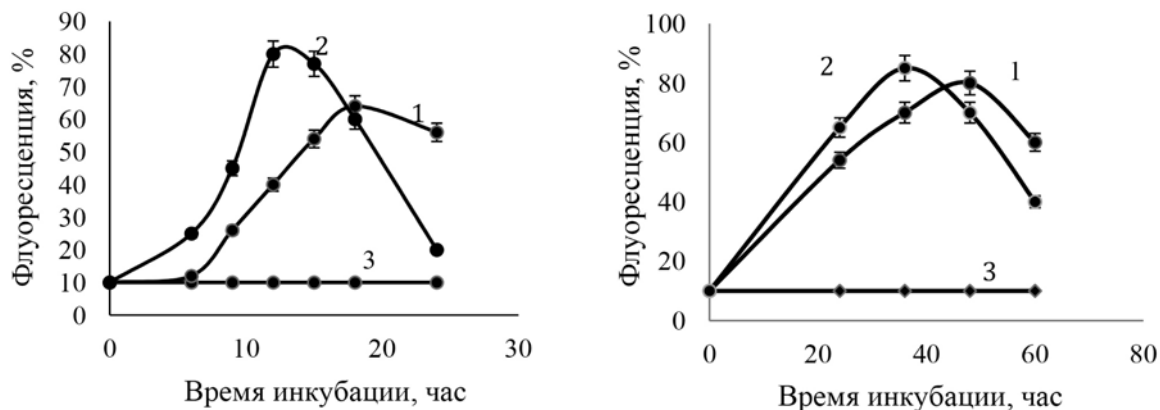


Рис. 3. Образование АФК у бактерий *S. epidermidis* GISK 33 (А) и грибов *R. solani* (В) в присутствии ЛО. 1) 5 мкг/мл, 2) 10 мкг/мл, 3) 0 мкг/мл

Было обнаружено увеличение внутриклеточного содержания АФК у бактерий *S. epidermidis* и фитопатогенных грибов *R. solani* в присутствии ЛО (увеличение флуоресценции дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата) (рис. 3). При этом имело место резкое уменьшение жизнеспособности клеток.

Увеличение содержания внутриклеточного уровня АФК было также показано как один из механизмов цитотоксического действия ЛО на модели клеточной линии феохромоцитомы крысы РС-12 [3].

Полученные результаты позволяют дифференцировать антимикробное действие ЛО, основанное на 1) образовании экзогенного пероксида водорода в результате каталитической реакции и 2) непосредственном взаимодействии ЛО с клеточной стенкой микроорганизма. При этом необходимо учитывать субстратную специфичность ЛО – проявление активности с лизином или дипаминопимелиновой кислотой, которые являются компонентами пептидогликанового слоя клеточной стенки [5].

В любом случае имеют место нарушение различных функции клеточной стенки и запуск процессов, подобных апоптозу. Вероятно, ЛО наряду с другими внеклеточными белками обеспечивает адаптивное преимущество продуценту в конкуренции с другими микроорганизмами.

Литература

1. Bernsdorff F., Döring A., Gruner K. et al. // Plant Cell – 2016. – Vol. 28. – P. 102–129.
2. Makrushin K.V., Medentsev A.G., Arinbasarova A.Y. et al. // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. – Editors: Sergey D. Varfolomeev – NY, USA: Nova Science Publishers, Inc. – 2012. – Chapter 2. –P. 7–16.
3. Lukasheva E.V., Makletsova M.G., Babayeva G., Arinbasarova A.Yu. et al. // Pharmaceuticals – 2020. – 13(11) – P. 398.
4. Yang C.A., Cheng C.H., Lo C.T. et al. // J. of agricultural and food chemistry – 2012. – Vol. 60, № 10. – P. 2464–2471.
5. Krupyanko V.I., Medentsev A.G., Lukasheva E.V. et al. // BBRP. – 2017. – Vol. 9. – P. 9–12.

Обследование посадок картофеля на наличие X вируса картофеля (Potato virus X) в некоторых регионах Российской Федерации

Башкирова И.Г., Пручкина М.А., Шнейдер Ю.А.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Московская обл., г.о. Раменский, р.п. Быково, bashkiroid@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38310

Род Potexvirus объединяет 37 видов, среди которых, более известные, вирус аукуба мозаики картофеля (PAMV) и X вирус картофеля (PVX) (Рогозина и др., 2016). X вирус картофеля является типовым

представителем рода *Potexvirus* и является одним из старейших известных вирусов картофеля – самые ранние научные сведения датируются 1938 годом (Loughnane, Murphy, 1983). Широкое распространение PVX в значительной степени связано с глобальной торговлей картофеля (Verchot, 2022). X вирус картофеля может инфицировать широкий спектр основных сельскохозяйственных культур семейства Пасленовые (*Solanaceae*), включая картофель (*Solanum tuberosum*), томат (*S. lycopersicum*), перец (*Capsicum* sp.) и табак (*Nicotiana tabacum*) (Cong et al., 2019). X вирус картофеля снижает качество семенного и продовольственного картофеля (Башкирова и др., 2022), вызывает мозаичное поражение листьев у растений.

Цель работы: анализ растительного материала картофеля, отобранного в различных регионах Российской Федерации, на заражение X вирусом картофеля (PVX).

Растительный материал картофеля отобран при обследовании посадок картофеля в Волгоградской (12 образцов), Иркутской (45) и Ростовской (13) областях.

Выделение РНК из образцов картофеля осуществляли с помощью набора «Проба-НК» (АгроДиагностика, Россия) по прилагаемой инструкции к набору. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали комплект реагентов для обратной транскрипции (OT-Random) (АгроДиагностика, Россия).

Для выявления и идентификации PVX методом ПЦР-РВ использовали коммерческие тест-системы отечественного производства: «Potato Virus X и Potato Virus Y-РВ» (Синтол) и «X вирус картофеля (Potato Virus X)» (АгроДиагностика). Амплификации осуществляли на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США).

В протестированном растительном материале картофеля X вирус картофеля (PVX) выявлен у 20% образцов с помощью тест-системы «Potato Virus X и Potato Virus Y-РВ» (Синтол, Россия). Среднее значение порогового цикла (Cq) по каналу FAM (специфичная реакция) составило $32,73 \pm 2,39$. Данные положительные образцы дополнительно проанализированы тест-системой «X вирус картофеля (Potato Virus X)» (АгроДиагностика, Россия). Результаты проведения ПЦР-РВ показали, что из 14 положительных образцов картофеля, в которых выявлен PVX с помощью тест-системы «Potato Virus X и Potato Virus Y-РВ», целевой вирус выявлено только у 50% образцов картофеля с помощью тест-системы «X вирус картофеля (Potato Virus X)». Cq по каналу FAM (специфичная реакция) составило $28,97 \pm 3,11$. Ингибирование реакции ПЦР не наблюдалось ни в одном из наборов, исходя из значений порогового цикла внутреннего положительного контроля (ВПК). Инфицирование растений картофеля PVX отмечено у образцов, отобранных в Иркутской области. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований с целью выяснения причин несоответствия результатов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ НИОКТР 122041400201-9).

Литература

1. *Рогозина Е.В., Мироненко Н.В., Афанасенко О.С., Мацухито Ю.* Широко распространенные и потенциально опасные для российского агропроизводства возбудители вирусных болезней картофеля // Вестник защиты растений. 2016. Т. 90. № 4. С. 24–33.
2. *Loughnane J., Murphy P.* Mode of dissemination of potato virus X // Nature. 1938. 141. P. 120–121.
3. *Verchot J.* Potato virus X: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus // Molecular Plant Pathology. 2022. Т. 23. №. 3. P. 315–320.
4. *Cong Q.Q., Wang Y., Liu J., Lan Y.F., Guo Z.K., Yang J.G., ... & Tian Y.P.* Evaluation of Potato virus X mild mutants for cross protection against severe infection in China // Virology Journal. 2019. Т. 16. № 1. P. 1–13.
5. *Башкирова И.Г., Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В., Хорина Н.А.* Изучение опасных вирусов и фитоплазм картофеля с использованием методов молекулярной диагностики // Сборник тезисов 25-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». Пущино: ФИЦ ПНЦ-БИ РАН, 2022. С. 9–10.

Роль ароматических аминокислот в механизме действия новых фунгицидных нуклеозидов с липофильной группой

Бидюк В.А.¹, Макаров Д.А.², Александрова Л.А.², Жгун А.А.³, Александров А.И.¹

¹ Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

³ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва,
victoria.bidiuk@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38311

Целый ряд грибковых патогенов вызывают смертельно опасные заболевания человека [1], наносят ущерб сельскохозяйственным животным и растениям [2], а также промышленным и культурным [3] объектам. При этом существует серьезный недостаток эффективных средств для борьбы с нежелательной грибной флорой. На данный момент наблюдается рост заболеваемости полирезистентными грибковыми заболеваниями, которые плохо поддаются лечению классическими антимикотическими препаратами [4]. Для решения проблемы высокой заболеваемости грибковыми заболеваниями, а также защиты продуктов сельского хозяйства и культурных объектов, необходимы создание и характеристика новых соединений, способных эффективно убивать клетки грибов.

В данной работе проводилось исследование механизма действия новых потенциальных антимикотических соединений, которые ранее эффективно ингибировали рост грибов-деструкторов, способных повреждать произведения темперной живописи [5, 6]. На данном этапе был исследован ряд N⁴-алкильных производных 2'-дезокситидина (SOV4, SOV5 и SOV8), которые содержали дополнительные модификации по 3'-положению остатка 2'-деокси-рибозы [7]. В качестве модельного организма были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм BY4742. Для того, чтобы определить, уровень каких белков поднимается в ответ на обработку SOV, был использован метод анализа небольшой коллекции штаммов с GFP-мечеными белками (64 белка) при помощи цитометрии [8]. В результате проведенного анализа нами было обнаружено, что в дрожжевых клетках повышается уровень белков, ответственных за биосинтез аминокислот, а также ряда других генов, в том числе, ответственных и за устойчивость клетки к окислительному стрессу. Это явление косвенно указывало на то, что аминокислоты играют определенную роль в механизме действия веществ SOV. Дальше нами было проверено, влияет ли продукция данных белков роль в токсичности SOV. Было обнаружено, что чувствительностью обладают мутанты, у которых был делетированы гены, ответственные за синтез ароматических аминокислот, причем наибольшей чувствительностью обладали штаммы, неспособные синтезировать тирозин и триптофан (Δ ARO7, Δ ARO1, Δ TRP5, Δ TYR1). При этом штамм, несущий делецию гена Δ PHA2 (ген, отвечающий за конечный этап синтеза фенилаланина) почти не отличался по чувствительности к SOV от дикого типа. Неспособность синтезировать другие аминокислоты не влияла на чувствительность к данному веществу.

Дополнительно роль именно ароматических аминокислот в устойчивости к SOV была подтверждена тем, что штаммы с делетированными генами TAT1 и TAT2, которые кодируют низкоафинный и высокоафинный транспортеры ароматических аминокислот соответственно, также обладали повышенной чувствительностью к SOV.

Таким образом, как собственная продукция, так и транспорт ароматических аминокислот извне играют важную роль в токсичности SOV.

Проведя тесты по оценке временной динамики гибели клеток при обработке SOV, мы обнаружили, что гибель наступает уже в течение 5-10 минут, что говорит о высокой вероятности влияния SOV на клеточную мембрану, что согласуется с наличием протяженной гидрофобной группы. Поскольку при этом наблюдается появление большого (до 50% от общего числа клеток в популяции) количества пермеабиллизированных клеток при использовании вещества в МИК, можно сделать заключение, что клетка теряет жизнеспособность именно в результате потери целостности клеточной мембраны. Далее, поскольку мы наблюдали индукцию белкового ответа на окислительный стресс в непремеабиллизированных

клетках, нами были проведены тесты на роль окислительного стресса в механизме действия SOV. Было показано, что инкубация клеток в питательной среде с SOV и одновременным добавлением антиоксиданта N-ацетилцистеина в концентрации 25 мМ полностью снимает токсический эффект исследуемого вещества – снижается количество мертвых клеток, а также понижается уровень упомянутых выше белков. Эффект добавления антиоксиданта оказался дозозависимым. Таким образом, окислительный стресс играет важную роль в механизме действия SOV. На это также указывает повышение уровня тиоредоксина Trx2, участвующего в защите клетки от окислительного стресса. Однако, при этом, этот окислительный стресс не детектируется флуоресцентными красителями DCFH-DA или DHE.

Полученные данные о токсичности соединений SOV4, SOV5 и SOV8 для клеток модельного объекта *S. cerevisiae* подтверждают ранее полученные данные о воздействии этих соединений на штаммы плесневых грибов-деструкторов темперной живописи [6, 7] и дают первое представление о возможных механизмах фунгицидной активности этих соединений.

Данная работа была выполнена при поддержке грантов РНФ № 21-74-10115 и РФФИ № 20-04-00094.

Литература

1. *Rodrigues M.L., Nosanchuk J.D.* Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials // PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science, 2020. Vol. 14, № 2.
2. *Fones H.N. et al.* Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens // Nature Food. Springer Nature, 2020. Vol. 1, № 6. P. 332–342.
3. *Tyagi P., Verma R.K., Jain N.* Fungal degradation of cultural heritage monuments and management options // Curr Sci. 2021. Vol. 121, № 12.
4. *Fisher M.C. et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security // Science (1979). 2018. Vol. 18, № 360. P. 739–742.
5. *Zhgun A. et al.* Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library of Science (PLoS), 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
6. *Alexandrova L.A. et al.* Discovery of novel N4-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // Eur J Med Chem. Elsevier Masson s.r.l., 2021. Vol. 215.
7. *Alexandrova, L.A. et al.* 3'-Amino modifications enhance antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides. // *New J. Chem.*, 2022, 46, 5614–5626.
8. *Levshin I.B. et al.* Antifungal Thiazolidines: Synthesis and Biological Evaluation of Mycosidine Congeners // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15, № 5. P. 563.

Оценка генотоксического потенциала роданида калия в тест-системе Эймса

Бударова В.Ю., Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Ломтева Н.А.,
Кондратенко Е.И., Братилова Д.М.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева»,
lilyagrigoryan90@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38312

Роданид калия (KCNS) является токсичным химическим веществом, которое имеет широкое распространение во флоре и фауне нашей планеты. В высоких концентрациях роданиды являются токсичными, так как вызывают или индуцируют генетические мутации [3]. Исследования, свидетельствуют о том, что роданид калия в различных концентрациях попадает в сточные воды, что вызывает гибель всей экосистемы [1, 4].

Хлорирование некоторых малотоксичных сточных вод хлором в концентрациях ниже токсичных, приводит к резкому возрастанию токсичности сточных вод для рыб. Попадание в организм больших количеств роданида калия влечет за собой повреждение зрения. Вред также может проявиться при попадании в желудочно-кишечные тракты, кожные покровы и дыхательные пути. В современном мире существует много химических методик, где важным реактивом является роданид калия. Поэтому очень важно изучить безопасность данного вещества.

За последние годы значительно расширились представления о характере процессов, которые приводят к развитию злокачественных новообразований. Стало понятным, что в основе этих процессов лежат изменения в генетическом материале и что многие канцерогены обладают способностью, при определенных условиях, индуцировать такие изменения. В связи с вышеизложенным исследования генотоксичности и отдаленных последствий действия роданида калия крайне важны. Имеется достаточное количество фактов, подтверждающих реальность опасности накопления KCNS в почве, воде и воздухе.

Тест-система Эймса позволяет изучить мутагенный потенциал химического вещества, его положительная реакция свидетельствует о канцерогенных свойствах [2, 5].

В качестве тестерных организмов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA 97, *S. typhimurium* TA 98 и *S. typhimurium* TA 100.

Для оценки генотоксичности исследуемых концентраций образцов роданида калия использовали тест Эймса на агаризованных питательных средах, которые содержат небольшое количество гистидина. Этого количества гистидина в среде достаточно, чтобы обеспечить жизнедеятельность и рост бактерий в течение некоторого времени и дать возможность успеть за это время мутировать. После исчерпания гистидина, содержавшегося в среде, выживают только ревертантные колонии, которые приобрели способность синтезировать собственный гистидин. Контролем служат бактерии, посеянные на среде, не содержащей исследуемого мутагенного фактора. Инкубация проводится в течение 48 часов. Мутагенный потенциал исследуемого вещества оценивается пропорционально числу обследованных колоний.

Тест Эймса предназначен для оценки мутагенного потенциала химических соединений. Положительный результат в тесте показывает, что химическое вещество может обладать канцерогенными свойствами. Данный метод используется как экспрессный анализ оценки канцерогенного потенциала различных химических соединений, и как дополнение другого аналогичного метода – стандартного теста на грызунах.

В тесте изучается возможность предполагаемого мутагена вызывать реверсивную мутацию данного гена, при которой штамм приобретает способность расти на среде, не содержащей гистидина. Предназначенные для тестирования штаммы подобраны таким образом, чтобы содержали обе рамки считывания и точечные мутации в генах ответственных за синтез гистидина, что позволяет обнаруживать мутации путём воздействия на различные механизмы. Некоторые химические соединения крайне специфичны и поэтому вызывают реверсии только в одном или двух штаммах [3]. Используемые в тесте штаммы также несут мутации в генах, ответственных за синтез липополисахарида, делаая клеточные стенки бактерий более проницаемыми [1]. Кроме того, отсутствие некоторых генов, ответственных за репарационные процессы, делает тест более чувствительным [5].

Полученные нами исследования показали отсутствие генотоксического действия роданида калия в отношении тест-штаммов.

Работа выполнена в рамках реализации проекта «Разработка экологически безопасного средства защиты растений на основе почвенных актинобактерий для восстановления агроэкосистем» по Программе развития Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева на 2021–2030 годы («Приоритет 2030»).

Литература

1. Абилев С.К., Порошенко Г.Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники. Сер.: Токсикология. 1986. № 14. С. 153–171.
2. Дудчик Н.В., Головач Т.Н., Курченко В.П. Возможности использования батареи краткосрочных тест-систем для определения генотоксичности веществ различной природы // Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2015. № 10. С. 398–405.

3. Колобородова Н.А., Снугур Г.Л., Куркин Д.В. Определение мутагенности вещества с антидиабетическим действием в микропланшетном варианте теста Эймса // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2015. № 2 (46). С. 54–57.
4. Gupta P., Mathur N., Bhatnagar P., Nagar P., Srivastava S. Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009. No. 72 (7). P. 1925–32.
5. Vijay U., Bhatnagar P., Mathur P. Mutagenicity Evaluation of Health Center wastewater with the mutant TA 100 and TA 102 strains of *Salmonella typhimurium* // *Inventi Impact: Pharm Biotech & Microbiol.* 2014. No. 4. P. 195–198.

Биоконверсия холестерина рекомбинантными штаммами *Mycolicibacterium smegmatis* с мутациями в генах окисления боковой цепи

Бяков А.А.^{1,2}, Карпов М.В.¹, Стрижов Н.И.¹, Шутов А.А.¹, Донова М.В.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
artyom.byakov.wrk@yandex.ru

² ФГБОУ ВО Пушинский государственный естественно-научный институт

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38313

Прогестерон является стероидным гормоном, вырабатываемым корой надпочечников, яичниками и семенниками млекопитающих. К его функциям относят поддержание беременности и другие репродуктивные функции, сохранение нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, участие в процессах образования и разрушения костной ткани, и стимуляция роста остеобластов. Процесс формирования прогестерона из холестерина протекает в два этапа: трехкомпонентная холестерингидроксилазная/C20-C22-лиазная ферментная система (ХГС) с цитохромом P450_{ssc} обеспечивает разрыв алифатической цепи в положении C20-C22 с образованием прегненолона, а 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, окисляет 3 β -ОН группу до 3-кето, в результате чего формируется прогестерон.

Ранее была продемонстрирована способность *Mycolicibacterium smegmatis* mc²155 Δ (*hsdD*, *kstD*, *kshB*) с мутациями в генах *MSMEG_5228* (3 β -гидроксистероиддегидрогеназа), *MSMEG_6039* (3-кетостероид-9 α -гидроксилаза) и *MSMEG_5941* (3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназа), несущего плазмидную конструкцию pNS11 с генами компонентов ХГС быка, накапливать и сохранять прогестерон в ходе биоконверсии стероидов. Однако, выход целевого продукта оставался низким вследствие микробной деградации субстрата [1]. Главной задачей по увеличению эффективности продукции прогестерона рекомбинантными микобактериями было предотвращение катаболизма холестерина собственными ферментными системами микобактериального хозяина. В связи с этим осуществлён поиск генов-мишеней, нокаут которых потенциально может позволить ингибировать окисление боковой цепи стероидов.

В более ранних исследованиях было описано, что у *M. smegmatis* имеются как минимум два фермента, инициирующих окисление боковой цепи: CYP125A3 (*MSMEG_5995*) и CYP142A2 (*MSMEG_5918*). Они относятся к группе стероидных монооксигеназ и катализируют гидрокселирование стероидов в положении атома углерода C26 [2]. Нокаут генов, кодирующих данные ферменты, снижают скорость деградации боковой цепи холестерина.

Целью работы явилось создание рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* mc²155 с делециями в генах окисления боковой алифатической цепи стероидов, гетерологически экспрессирующих гены компонентов ХГС коры надпочечников быка.

Для введения делеций был применен метод гомологической рекомбинации, в ходе которого были получены штаммы *M. smegmatis* Δ (*hsdD*, *kstD*, *kshB*, *cyp142*), *M. smegmatis* Δ (*hsdD*, *kstD*, *kshB*, *cyp125*) и *M. smegmatis* Δ (*hsdD*, *kstD*, *kshB*, *cyp142*, *cyp125*). Наличие мутации в целевых генах было подтверждено ПЦР скринингом. Мутантные штаммы продемонстрировали способность к более медленному окис-

лению холестерина в сравнении со штаммом-предшественником. Для дальнейшей работы был выбран *M. smegmatis* $\Delta(hsdD, kstD, kshB, cyp142, cyp125)$, так как скорость катаболизма холестерина собственными ферментами данного штамма была самой низкой.

Рекомбинантная плазида pNS11 методом электропорации была перенесена в компетентные клетки мутантного штамма *M. smegmatis* $\Delta(hsdD, kstD, kshB, cyp142, cyp125)$. Была осуществлена биоконверсия стерина с использованием *M. smegmatis* mc²155 $\Delta(hsdD, kstD, kshB, cyp142, cyp125)$ (pNS11) в сравнении с ранее полученным рекомбинантным штаммом *M. smegmatis* mc²155 $\Delta(hsdD, kstD, kshB)$ (pNS11). Холестерин (3 г/л), вносили в культуральную жидкость в виде водного раствора с метил- β -циклодекстрином спустя 36 часов индукции синтеза белков ХГС. Результаты анализа методами ТСХ и ВЭЖХ демонстрируют снижение скорости окисления холестерина и более эффективное накопление прогестерона штаммом *M. smegmatis* $\Delta(hsdD, kstD, kshB, cyp142, cyp125)$ (pNS11). Таким образом, впервые показано, что нокаут генов, кодирующих начальные этапы окисления алифатической боковой цепи стерина у рекомбинантных микобактерий, способствует повышению выхода прогестерона в процессе биоконверсии холестерина.

В литературе был также описан дополнительный фермент CYP125A4, способный к С26-гидроксилированию холестерина [3]. Ген *MSMEG_3524*, кодирующий данный белок, может служить следующей мишенью для проведения мутагенеза с целью получения штамма *M. smegmatis*, несущего метаболические блоки на уровне окисления боковой цепи стерина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-64-00024).

Литература

1. Карпов М.В., Стрижов Н.И., Шутков А.А., Донова М.В. Биоконверсия холестерина в прогестерон рекомбинантными штаммами *Mycobacterium smegmatis* mc²155 с делециями в генах окисления стероидного ядра // VI Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 2019. С. 200–201.
2. Galan B., Garcia-Fernandez J., Felpeto-Santero C., Fernandez-Cabezón L., Garcia J.L. Bacterial Metabolism of Steroids // *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*. 2019. P. 315–336.
3. Frank D.J., Waddling C.A., La M., Ortiz de Montellano P.R. Cytochrome P450 125A4, the Third Cholesterol C-26 Hydroxylase from *Mycobacterium smegmatis* // *Biochemistry*. 2015. V. 54. № 46. P. 6909–6916.

Целевая инактивация генов пептидов с антимикробной активностью в геноме штамма *Bacillus pumilus* 3-19

Васильева Ю.А.

Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
vasileva891@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38314

Представители рода *Bacillus*, эффективно продуцируют различные гидролитические ферменты, в том числе протеиназы, которые часто применяются в современной сельскохозяйственной, фармацевтической и пищевой промышленности. Широкая субстратная специфичность и устойчивость в обширных диапазонах рН и температуры позволяют целенаправленно использовать бациллярные протеиназы в практических целях.

Актуальными кандидатами для получения протеиназ являются бактерии *Bacillus pumilus* 3-19. Однако внеклеточное продуцирование целевого фермента с помощью бацилл затруднено из-за многих физиологических процессов таких как спорообразование, конкурентная секреция поверхностных липопептидов

и антимикробных метаболитов. В связи с этим, мы предположили, что ресурсы клеток *B. pumilus* 3-19 будут использоваться более эффективно при экспрессии генов протеиназ после инактивации генов кандидатов бацилизина и бактериоцина. Одним из методов решения данной проблемы является технология CRISPR-Cas9, которая применяется для создания штаммов-продуцентов с необходимыми экономически выгодными свойствами.

Целью данного исследования являлась инактивация генов пептидов с антимикробной активностью в геноме штамма *B. pumilus* 3-19 с помощью CRISPR-Cas9 технологии. В работе использовался вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR-Cas9. Гидовая-РНК была получена путем гибридизации праймеров. Рестрикция вектора проводилась с помощью фермента BsaI. Лигирование конструкции выполняли с использованием T4 ДНК-лигазы. Путем ПЦР амплификации с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 были получены фрагменты генов бацилизина и бактериоцина, которые встраивали в вектор по сайту SfiI. Клонирование полученных конструкций, содержащих систему CRISPR-Cas9, гидовую-РНК и ДНК-матрицу для гомологичной репарации – фрагменты генов бацилизина (pDIb11.21) и бактериоцина (pVYb11.21), проводили в клетках *E. coli* DH5a. Целостность конструкций подтверждали секвенированием. Для инактивации генов-мишеней, клетки *B. pumilus* 3-19 трансформировали полученными векторами. Эффективность трансформации конструкцией pDIb11.21 составила ~121 трансформантов/мкг ДНК, а для конструкции pVYb11.21 ~155 трансформантов/мкг ДНК. С помощью ПЦР анализа подтвердили наличие полученных конструкций, содержащих систему CRISPR-Cas9. Целевую инактивацию генов бацилизина и бактериоцина проводили с помощью полученных плазмид. Таким образом, нами были получены мутантные штаммы *B. pumilus* 3-19 с неактивными генами антимикробных пептидов – бацилизина и бактериоцина, соответственно. В дальнейшем планируется провести описание физиологических свойств полученных мутантных штаммов.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (приоритет 2030).

Белковая система антигенов *Bacillus anthracis*

Воронов А.В.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, voloonter.rf@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38315

Bacillus anthracis – грамположительные бактерии, образующие споры. При заражении организма вызывают остро и подостро протекающую болезнь – сибирскую язву. Возбудитель относится ко второй группе патогенности. В процессе своей жизнедеятельности микроорганизм выделяет ряд антигенов, обладающих иммуноформирующим действием. Антигены возбудителя оказывают токсическое действие на организм и способствуют иммунному ответу. В статье будут рассмотрены структуры антигенов сибиреязвенной палочки, их строение и функции, а также кодирующий их генетический аппарат.

Общая характеристика возбудителя

Возбудитель сибирской язвы – анаэробный (факультативный, необязательный) грам-положительный, не имеющий органов для передвижения, организм. Отнесен ко II классу патогенности. Концы клеток микробов при близком рассмотрении имеют вид «бамбуковой трости». Тело бактерии имеет форму, близкую к стержневой с обрубленными концами.

В центре организм располагается структура, именуемая «спорангий». Здесь происходит развитие спор. Оболочка бактерий толстая, т.е. они являются грам-положительными. Оболочка состоит из пептидогликана. В качестве питания возбудитель может использовать различные субстраты, как белки, так и углеводы.

Характеристика строения антигенов

Различают три вида антигенов бактерии, вызывающей сибирскую язву: соматический антиген, капсульный антиген, Экзотоксин.

Соматический антиген, или ST-антиген клеточной стенки. Представляет собой полисахарид. Единственный антиген возбудителя, не имеющий белковой природы. Состоит соматический антиген из N-ацетил-D-глюкозамина в сочетании с D-лактозой. Капсульный антиген, или K-антиген – имеет полипептидную природу. Связан с молекулами D-гултаминовой кислоты. Не играет важной роли на стадии прорастания спор. Его структура и функции недостаточно изучены.

В противовес ему наиболее полные данные имеются по экзотоксину, выделяемому *B. Anthracis*. Экзотоксин состоит из трех компонентов: эндоматозный (вызывает отеки и воспаления), защитный антиген и летальный компонент. Интерес для нас представляет именно протективный антиген.

Полипептидные цепочки располагаются в форме кольца. Именно проективный антиген экзотоксина отвечает за выработку организмом хозяина антител. Сам по себе защитный антиген не может оказывать патологического воздействия на организм.

По причине того, что в чистом виде протективный антиген не может вызывать цитотоксического эффекта, его активно используют в разработке вакцин против сибирской язвы.

Результаты работы

В ходе работы были рассмотрены структура, функции, а также, как в последнем случае, применения антигенов белковой системы *Bacillus anthracis*. На данный момент ведутся активные исследования антигенов сибиреязвенной палочки и имеющиеся данные пока слишком скудны. Однако, уже нашли свое применения в разработке вакцин, доказавших свою высокую эффективность.

Литература

1. *Абалкин В.А.* Влияние протективного антигена на формирование иммунитета под действием сибиреязвенных живых вакцин / В.А. Абалкин, Н.П. Буравцева, Б.Л. Черкасский // Журн. микробиол. 1990. № 5. С. 72–75.
2. *Бакулов И.А.* Сибирская язва (антракс): новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир: Посад, 2001. 278 с.
3. *Баркова И.А.* Иммунодиагностическая оценка белков, продуцируемых штаммами *B. anthracis* с различным профилем плазмид вирулентности: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Волгоград, 2007. 22 с.
4. *Безносков М.В.* Выделение и изучение специфических антигенов *Bacillus anthracis* с целью конструирования диагностических и профилактических препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Саратов, 1997. 22 с.

Функционально-метаболическая активность микроорганизмов рода *Lactobacillus*, изолированных из вагинального биотопа

Годовалов А.П., Карпунина Т.И.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет
им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России,
AGodvalov@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38316

Общепризнано, что у женщин с длительно текущими воспалительными процессами в репродуктивном тракте существенно меняется спектр микроорганизмов, в том числе рода *Lactobacillus* [1, 2]. В первую очередь отмечается, что лишь у половины женщин количество лактобактерий сохраняется в пределах возрастной нормы на фоне увеличения их видового разнообразия. С постоянством преобладают представители *L. kunkeei*, *L. johnsonii*, *L. delbrueckii*, *L. amylolyticus* [2], что не типично для описанных вариантов вагинальной микрофлоры [4]. Между тем, как известно, состояние вагинального микробио-

ценоза определяется именно функционально-метаболической активностью лактобактерий, которые обеспечивают колонизационную резистентность биотопа. Среди метаболитов приоритетное значение принадлежит молочной кислоте, совокупную выработку которой в значительной степени обуславливает количество и биодоступность субстратов. Так, например, *L. crispatus* обладает рядом ферментов для деградации гликогена и обеспечения доступности глюкозы для метаболизма её в лактат [5]. Другие виды *Lactobacillus* нуждаются в субстратах, богатых фруктозой. Представляет интерес изучение функционально-метаболической активности лактобактерий – обитателей вагинального биотопа женщин при вялотекущем воспалении.

Материалы и методы

Проведено исследование 206 образцов цервико-вагинального отделяемого. Посев осуществляли в полужидкую среду МРС, разлитую высоким столбом, с последующим пересевом на кровяной агар (КА). Аэротолерантность лактобактерий оценивали по их способности формировать колонии на КА в аэробных условиях. Через 72 ч культивирования в среде МРС определяли концентрацию молочной кислоты при помощи набора «Молочная кислота-Ольвекс» (Россия), а уровень глюкозы – глюкозооксидазным методом (Вектор-Бест, Россия), согласно инструкциям. Особенность использования наборов заключалась в пропорциональном уменьшении объема участников реакции.

Для изучения кинетики роста в питательную среду МРС, разлитую в лунки плоскодонного полистиролового планшета, вносили тест-штаммы. Культивирование осуществляли в течение 72 ч при 37 °С. Каждый час проводили измерение оптической плотности при длине волны 580 нм на планшетном спектрофотометре PowerWave X (Bio-Tek).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Установлено, что 44% штаммов лактобактерий за срок наблюдения с трудом адаптировались к условиям культивирования *in vitro* с минимальным накоплением биомассы. Еще 30% штаммов к 30 ч наблюдений вступали в экспоненциальную фазу роста. Оставшиеся 26% штаммов к 12 ч выходили в фазу экспоненциального роста, а к 36 ч переходили в стационарную фазу. Аналогичным образом менялась и продукция молочной кислоты. Среди первой группы штаммов синтез этого метаболита находился на низком уровне, микроорганизмы второй группы – медленно наращивали продукцию лактата и только штаммы третьей группы на момент перехода в стационарную фазу показывали пик продукции молочной кислоты. При этом штаммы лактобактерий первой группы выделены из образцов, в которых присутствовали представители семейства *Enterobacteriaceae* и/или рода *Candida*. В образцах второй группы среди ассоциантов встречались, как правило, бактерии кокковой группы, а наиболее активные штаммы (третья группа) изолированы в монокультуре.

Прослежена корреляция между способностью лактобактерий расти в аэробных условиях и выработкой молочной кислоты ($r = 0,51$). В аэробных условиях штаммы интенсивно утилизировали глюкозу из МРС с ее исходным содержанием 50 ммоль/л. Через 72 ч концентрация глюкозы составляла $1,3 \pm 0,3$ ммоль/л. При культивировании образцов, отобранных при патологических состояниях с детекцией представителей семейства *Enterobacteriaceae* и/или родов *Candida*, продукция молочной кислоты оказалась минимальной, как и утилизация глюкозы из среды, что соответствует более низкой продуктивности анаэробного метаболизма и косвенно указывает на доминирование строго анаэробных видов лактобактерий.

Можно полагать, что участники микробного сообщества оказывают негативное влияние на лактобактерии, что выражается как правило, в смене их видового состава и изменении функционально-метаболической активности. Так, для подавления роста *E. coli* требуется значительная продукция молочной кислоты [3], что является характеристикой лишь некоторых видов лактобактерий [4]. Представляется, что аэротолерантность лактобактерий ассоциируется с их более высокой антагонистической активностью в отношении условно патогенных микроорганизмов, что подтверждено в настоящем исследовании, когда лактобактерии-продуценты лактата выделены в виде монокультур.

Определение уровня молочной кислоты в среде культивирования с учетом чувствительности лактофлоры к кислороду существенно расширяет возможности бактериологической диагностики нарушений цервико-вагинальной микробиоты.

Литература

1. Бухарин О.В., Кремлева Е.А., Сгибнев А.В., Черкасов С.В. Роль доминантной микрофлоры в механизмах защиты вагинального биотопа женщин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013; 6: 100–104.
2. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Состав микробиоты репродуктивного тракта женщин при бесплодии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(1): 77–85.
3. Hudson P.L., Hung K.J., Bergerat A., Mitchell C. Effect of Vaginal Lactobacillus Species on Escherichia coli Growth // Female Pelvic Med. Reconstr. Surg. 2020; 26(2): 146–151.
4. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108(1): 4680–7.
5. Van der Veer C., Hertzberger R.Y., Bruisten S.M., Tytgat H.L.P., Swanenburg J., de Kat Angelino-Bart A., Schuren F., Molenaar D., Reid G., de Vries H., Kort R. Comparative genomics of human Lactobacillus crispatus isolates reveals genes for glycosylation and glycogen degradation: implications for in vivo dominance of the vaginal microbiota // Microbiome. 2019; 7(1): 49.

Влияние нарингенина на рост и сигналинг *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*

Гончарова А.М., Ломоватская Л.А.

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
alvlad87@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38317

Известно, что в молекулярном диалоге бобовых и ризобий большое значение имеют сигнальные молекулы бактерий, в частности цАМФ – продукт функционирования аденилатциклазы и вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы. Кроме хорошо известной роли этой сигнальной молекулы в регуляции генов катаболической репрессии, цАМФ ризобий принимает участие в становлении бобово-ризобиального симбиоза (Catanese et al., 1989; Tian et al., 2012).

Со стороны бобовых в становлении симбиотических отношений важную роль играет нарингенин, секретируемый в составе корневых экссудатов. Так, нарингенин гороха (*Pisum sativum*) индуцирует активацию *nod*-генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, направленную на синтез ризобиальных Nod-факторов (NF), играющих важную роль на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза (Глянько, 2014). Однако неизвестно, оказывает ли нарингенин влияние на активность ферментов сигнальных систем бактерий, например, аденилатциклазы. Поэтому целью настоящей работы было изучение влияния нарингенина на активность трансмембранной формы аденилатциклазы (тАЦ) в планктонной культуре *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.

Результаты исследований показали, что нарингенин практически не оказывал влияния на рост планктонной культуры ризобий, однако активность тАЦ при культивировании ризобий с 1 мкМ нарингенина возрастала почти до 400%.

Для проверки гипотезы о лиганд-рецепторном механизме активации тАЦ нарингенином, к среде роста бактерий в планктонной культуре добавляли 500 мкМ сурамина, ингибитора тАЦ, разобщающего связь рецептора с G-белком. В этих условиях активность фермента через 5 дней инкубации снижалась более, чем на 70% (рис. 1). Однако при одновременной инкубации с сурамином (500 мкМ) и нарингенином (1 мкМ) в течение 5 дней активность тАЦ восстанавливалась, и даже наблюдалась ее существенная активация, до 250% от контроля (рис. 1).

Поскольку нарингенин активировал тАЦ, а сурамин, разобщающий связь рецептора с G-белком, ингибировал ее активность, есть основание полагать, что у ризобий имеются рецепторы к нарингенину, одним из компонентов которых может быть тАЦ. Подтверждением этому могут служить литературные

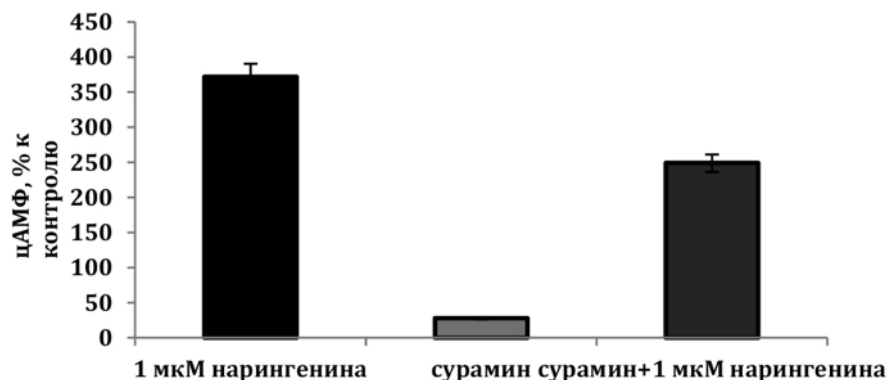


Рис. 1. Влияние нарингенина и сурамина на активность тАЦ в планктонной культуре *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.
n = 3, m ± S.E

данные о том, что при контакте *Sinorhizobium meliloti* с *Medicago sativa* активируются три рецептороподобные аденилатциклазы, регулятор транскрипции и целевой ген (Tian et al., 2012).

Таким образом, возможно, что у бактерий, так же, как и у растений, тАЦ функционирует в виде многофункциональных молекулярных комплексов, в состав которых входит и рецепторный домен. Вероятно, это один из механизмов влияния нарингенина на метаболизм мутуалистических бактерий на начальных этапах азотфиксирующего симбиоза.

Литература

1. Глянько А.К. Роль Nod-фактора *Rhizobium* в индукции сигнальных систем растения при формировании бобово-ризобиального симбиоза / А.К. Глянько // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2014. – № 3. – С. 6–14.
2. Catanese C.A., Emerich D.W., Zahler W.L. Adenylate cyclase and cyclic AMP phosphodiesterase in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids / C.A. Catanese, D.W. Emerich, W.L. Zahler // Journal of bacteriology. – 1989. – V. 171. – N 9. – P. 4531–4536.
3. Tian C.F. Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago symbiosis* / C.F. Tian, A.M. Garnerone, C. Mathieu-Demazière, C. Masson-Boivin, J. Batut // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – N 17. – P. 6751–6756.

Поиск новых биотехнологически ценных целлобиозодегидрогеназ

Горина С.Ю., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
sofya.gorina.1991@mail.ru; mpkolomytseva@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38318

Целлобиозодегидрогеназа (cellobiose dehydrogenase – CDH) – внеклеточная оксидоредуктаза, наиболее распространенная среди грибов, участвует в разложении древесины, окисляя целлобиозу и олигосахариды до δ-лактонов [1]. В структуре типичных целлобиозодегидрогеназ имеется два пространственно и функционально обособленных домена: флаводегидрогеназный домен (DH), связывающий кофактор FAD и участвующий в переносе электрона от молекулы сахара к цитохромсвязывающему гемсодержащему домену (СУТ), в свою очередь осуществляющему последовательный перенос электрона к лити-

ческой полисахаридмонооксигеназе (LPMO – lytic polysaccharide monoxygenase) с последующим восстановлением иона меди активного центра LPMO (рис. 1).

Благодаря способности к переносу электронов, CDH может быть использована в качестве универсального элемента в электрохимических биосенсорах, анодах ферментативных биотопливных элементов и биосуперконденсаторах [3].

На основании филогенетического анализа генов, кодирующих CDH, выделяют несколько классов целлюбиозодегидрогеназ: I, II, III и IV [2]. Ферменты CDH классов I и II выделены и охарактеризованы, в то время как CDH классов III и IV еще не исследованы.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей целлюбиозодегидрогеназ III класса с CDH других классов и их сравнительный анализ показали, что CDH класса III обладают близкой к CDH класса I и II общей структурой, однако имеют отличия в области субстрат-связывающего центра. Результатом этого может быть изменение функциональной активности ферментов, позволяющее существенно расширить границы их применения вплоть до создания принципиально новых технологий.

В результате поиска генов, кодирующих целлюбиозодегидрогеназы различных классов в известных геномах грибов, и филогенетического анализа белков, кодируемых этими генами, было осуществлено исследование разнообразия CDH у грибов различных таксономических групп. Показано наличие в геномах исследованных грибов от одного до нескольких генов, кодирующих CDH-подобные ферменты.

Разработаны новые подходы к быстрой и эффективной идентификации CDH при твердофазном и погруженном культивировании грибов. Для грибов – продуцентов CDH, близких к аскомицетам, содержащим гены, кодирующие ранее неизученные CDH класса III, проведен широкомасштабный скрининг целлюбиозодегидрогеназной активности. Впервые исследованы особенности продукции CDH исследованными аскомицетами, а также субстратная избирательность этих CDH. Продемонстрирована способность аскомицетов продуцировать множественные формы CDH, обладающие различной субстратной избирательностью.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-АН-Фа № 21-54-14009.

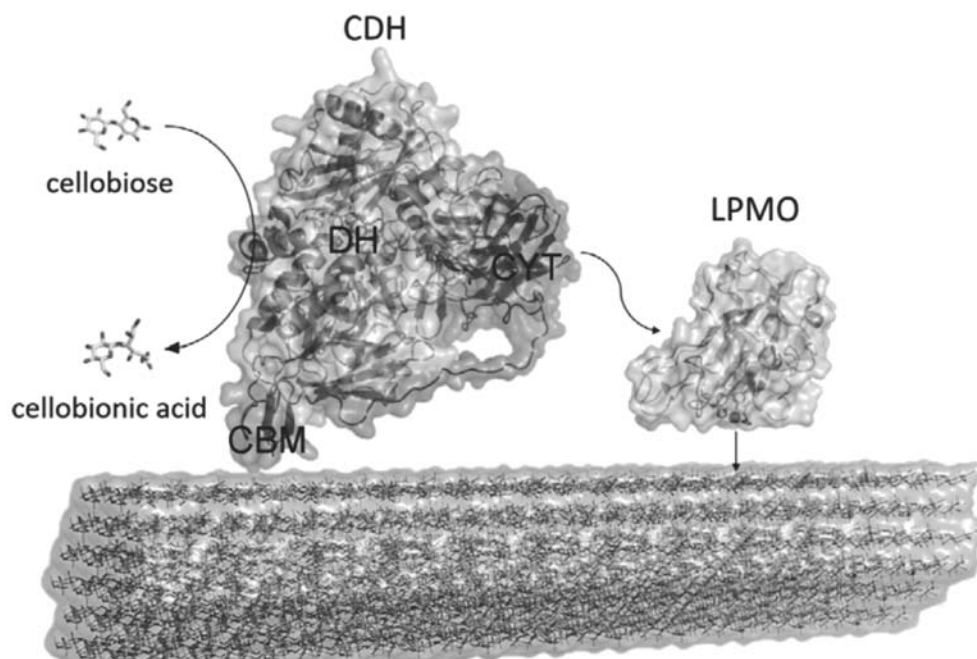


Рис. 1. Пространственная структура и механизм действия типичной CDH класса II. DH – дегидрогеназный домен CDH, CYT – цитохромный домен CDH, CBM – субстрат связывающий домен CDH. LPMO – литическая полисахаридмонооксигеназа [2]. Стрелочками обозначен путь переноса электронов в ходе каталитического расщепления олигосахаридов ферментной парой CDH-LPMO

Литература

1. Ayers A.R., Ayers S.B., Eriksson K.E. Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum* // European Journal of Biochemistry – 1978. – V. 90. – P. 171–181.
2. Csarman F., Wohlschlager L., Ludwig R. Chapter Fifteen – Cellobiose dehydrogenase // The Enzymes – 2020. – V. 47. – P. 457–489.
3. Scheiblbrandner S., Ludwig R. Cellobiose dehydrogenase: Bioelectrochemical insights and applications// Bioelectrochemistry. – 2020. – Т. 131. – С. 107345.

Исследование компонентного состава метаболитов бактерий *Nocardiosis umidischolae* методом качественных реакций

Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Братилова Д.М.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева»,
lilyagrigoryan90@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38319

Большое разнообразие обнаруженных в природе продуктов вторичного обмена актиномицетов включает огромное число химических структур. Вторичные метаболиты, синтезируемые актиномицетами, обладают антибиотическими свойствами (антимикробными, противовирусными) [3, 5]. Кроме того, описан ряд веществ с другим характером биологического действия: ингибиторы ферментов, гербициды, инсектициды, находящие применение в растениеводстве [4].

Исследуемые изоляты № 2 и № 18, представленные видом *N. umidischolae* являются нокардиоформными актиномицетами, относящимися к роду *Nocardia* – это аэробы с мицелиальной стадией в цикле развития и не имеющие настоящих спор. Мицелий данных микроорганизмов может распадаться на элементы, образуя цепочки, подобные спорангиям [2].

Цель настоящих исследований – изучить компонентный состав суспензии и экстрактов изолятов *N. umidischolae* № 2 и *N. umidischolae* № 18 методами качественных реакций.

Объектами исследования явились трехсуточные суспензии с титром клеток 10^9 КОЕ/мл и 5 вариантов экстрактов (водно-спиртовой в трех модификациях: 80%:20%; 50%:50%; 20%:80%, метанольный и гексановый) изолятов *N. umidischolae* № 2 и *N. umidischolae* № 18, обладающих высокими показателями инсектоакарицидных свойств, а также характеризующихся фитостимулирующей активностью.

С целью исследования химического состава суспензии и экстрактов бактерий были проведены качественные реакции для определения флавоноидов, алколоидов, гликозидов и сапонинов [1].

Флавоноиды изучали реакцией с раствором аммиака: к 1 мл фильтрата добавляли 3–5 капель раствора аммиака. Так, флавоны, флаванолы, флаваноны приобретают желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное; халконы и ауроны – оранжевое или красное; антоцианы – синее или фиолетовое.

Реакцией осаждения Вагнера-Бушарда определяли наличие алкалоидов: в пробирку с 2 мл экстракта добавляли 3–5 капель реактива Вагнера-Бушарда. Кроме того, данную группу веществ исследовали реакцией Марки: к 2 мл экстракта добавляли 3–5 капель реактива Марки (серная кислота + формалин 40%-ный в соотношении 25:1). В результате данных опытов алкалоиды выпадают в бурый осадок.

Гликозиды исследовали реакцией Келлер-Килиани на углеводную часть молекулы следующим образом: готовили 2 раствора – в первую пробирку наливали 1–2 мл ледяной уксусной кислоты, во вторую – 1–2 мл концентрированной серной кислоты. В первую пробирку добавляли 1 мл исследуемого экстракта. Затем из первой пробирки осторожно по стенке приливали раствор во вторую пробирку. При наличии гликозидов на границе двух слоев появляется бурое, темно-бурое окрашивание, сверху окрашенной полосы постепенно возникает сине-зеленый или зеленый слой.

Реакцией пенообразования (модификация физического метода) анализировали присутствие сапонинов. Экстракт (водный) встряхивали в пробирке в течение 15 секунд. Не исчезающая в течение 15 минут пена говорит о возможном присутствии сапонинов.

Для определения основных групп веществ в исследуемых экстрактах и суспензии были проведены качественные реакции на обнаружение гликозидов, сапонинов, алколоидов, флавоноидов в составе метаболитов исследуемых бактерий. У двух изолятов обнаружены схожие вещества. Установлено, что в суспензии и экстрактах обоих изолятов *N. umidischolae* сапонины не обнаружены, что свидетельствует об их отсутствии или незначительном количестве.

Наличие флавоноидов установлено во всех исследуемых образцах изолятов, за исключением гексанового экстракта. Идентичный результат получен в реакции на определение гликозидов. Реакция на определение алколоидов показала их присутствие во всех анализируемых пробах, кроме суспензии изолятов, в которых данная группа веществ представлена в очень малом количестве или полностью отсутствует. У изолята *N. umidischolae* № 18 алколоиды обнаружены лишь в водно-спиртовом (20%:80%) и гексановом экстрактах. В гексановых экстрактах обнаружены только алколоиды.

При проведении качественных реакций на обнаружение гликозидов изумрудное кольцо образовалось во всех водно-спиртовых экстрактах и суспензии, а также в метанольном экстракте штамма *N. umidischolae* № 2, что говорит об их наличии.

Как показали исследования, изучение компонентного состава метаболитов исследуемых штаммов методом качественных реакций подтвердило наличие широкого спектра веществ в суспензии, а также в экстрактах: водно-спиртовых в трех концентрациях (20%:80%, 50%:50%, 80%:20%), метанольном и гексановом. В составе метаболитов изолятов *N. umidischolae* № 2 и *N. umidischolae* № 18 обнаружены гликозиды, алколоиды и флавоноиды. Таким образом, изоляты № 2 и № 18, представленные видом *N. umidischolae*, исследованные методами качественных реакций обладают богатейшим источником разнообразных по химическому строению и спектру действия биологически активных веществ.

Работа выполнена в рамках реализации проекта «Разработка экологически безопасного средства защиты растений на основе почвенных актинобактерий для восстановления агроэкосистем» по Программе развития Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева на 2021–2030 годы («Приоритет 2030»).

Литература

1. Астафьева О.В., Баймухамбетова А.С. Практические занятия блока «Технология получения биологических активных веществ» дисциплины «Технология белка и БАВ» // Астрахань: Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева. 2015. 51 с.
2. Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Курашов Е.А., Крылова Ю.В., Федорова Е.В., Явид Е.Я., Ходонович В.В., Яковлева Л.В. Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 172–178. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.25750/1995-4301-2021-3-172-178.
3. Duraipandiyar V., Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7 // The Kaohsiung Journal of Medical Sciences. V. 30. No 9. 2014. P. 435–446.
4. Pathalam G.R., Host A.D., Appadura D.R., Munusamy R.G., Michael G.P., Savarimuthu I., Naif A.A. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. V. 6. No 2. 2017. P. 209–217.
5. Romero-Rodriguez A., Ruiz-Villafan B., Tierrafria V.H., Rodriguez-Sanoja R., Sanchez S. Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* // Appl. Biochem. Biotechnol, 2016. No 180. P. 1152–1166.

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории ЮФО и СКФО

Деняк А.К.¹, Хачатурова А.А.²

¹ ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь

² ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38320

Бруцеллез является одной из самых распространенных зоонозных инфекций. Наиболее сильно страдает животноводство, заболевание наносит ему крайне высокий ущерб. В свете данного факта возникает необходимость разработки мер, которые будут направлены как на непосредственную борьбу с заболеванием, так и на предупреждение распространения бруцеллеза, а также многопрофильный мониторинг за возбудителем. В этом случае главными противоэпидемическими мерами будут являться: идентификация возбудителя заболевания, отслеживание места его распространения [2].

Целью данного исследования являлся анализ молекулярно-генетического разнообразия штаммов *Brucella melitensis*, распространенных на наиболее неблагоприятных по эпидемиологической обстановке территориях Южного федерального округа и Северо-Кавказского федерального округа.

В течение 1999–2019 гг. у жителей проблемных по обстановке бруцеллеза территорий Южного федерального округа и Северо-Кавказского федерального округа выделялись и анализировались изоляты возбудителя. Сопоставление с базой данных MLVA-генотипов [4] показало, что самое близкое сходство у изолятов наблюдается с MLVA-8-генотипами 42 и 45. Эта информация подтверждается литературными данными о циркуляции изолятов этих генотипов на территории Российской Федерации и в государствах (Монголия, Казахстан, Китай), граничащих с юго-восточной частью России (Дальневосточные регионы, Сибирь) [1, 3]. Было выявлено, что референтный штамм *Brucella melitensis* 63/9 (впервые выделен в Индии в 1963 г.) имеет самое близкое генетическое родство со всеми изолятами бруцелл, выделенными на территориях Южного федерального округа и Северо-Кавказского федерального округа.

В ходе исследования были задействованы панели MLVA-15, MLVA-16, в которые входили вариативные локусы *Bruce* 4, *Bruce* 7, *Bruce* 9, *Bruce* 16, *Bruce* 30. Благодаря этому были дифференцированы штаммы бруцелл, выделенные на вышеупомянутых территориях. Также это позволило сопоставить генотипы возбудителей с местом их выделения. Штаммы, выделенные на самых неблагоприятных граничащих друг с другом субъектах Южного федерального округа и Северо-Кавказского федерального округа, были дифференцированы благодаря вариативности локуса *Bruce* 19. Были сформированы две группы с различным числом tandemных повторов: первая группа была образована штаммами, выделенными на территориях Республики Калмыкия и Ставропольского края (39 tandemных повторов, 72% выборки); вторая группа была образована изолятами бруцелл, выделенными на территории Республики Дагестан (41 tandemный повтор, 28% выборки). Было выяснено, что изоляты бруцелл, выделенные в 1999–2019 гг. в административных районах Республики Калмыкия, и часть изолятов, выделенных на территории Ставропольского края в 2018–2019 гг., совпадают по MLVA-16-генотипам.

Используя MLVA-генотипирование был проведен кластерный анализ. Было выявлено, что на исследуемых территориях находится смешанная популяция вида *Brucella melitensis*. Все проанализированные штаммы были сгруппированы в 4 кластера (рис. 1). Штаммы, выделенные на территориях Ставропольского края и Республики Дагестан в период 1999–2014 гг., сформировали 1 и 2 кластера (в 1 кластере также находится референтный штамм *Brucella melitensis* 63/9). Штаммы, выделенные на территории Республики Калмыкия в период 2014–2019 гг., сформировали 3 и 4 кластера.

В целом было выяснено, что на исследуемых неблагоприятных по бруцеллёзу территориях Южного федерального округа и Северо-Кавказского федерального округа находится смешанная популяция вида *Brucella melitensis*. Это типично для данных регионов, однако одновременно с этим не наблюдается приуроченности выделенных штаммов к отдельным субъектам. Также было показано, что все изоляты, выделенные на вышеперечисленных территориях, формируют две группы, различные по вариативности локуса *Bruce* 19 в MLVA-16-генотипе. Благодаря числу tandemных повторов (39, 41) возможно сопоста-

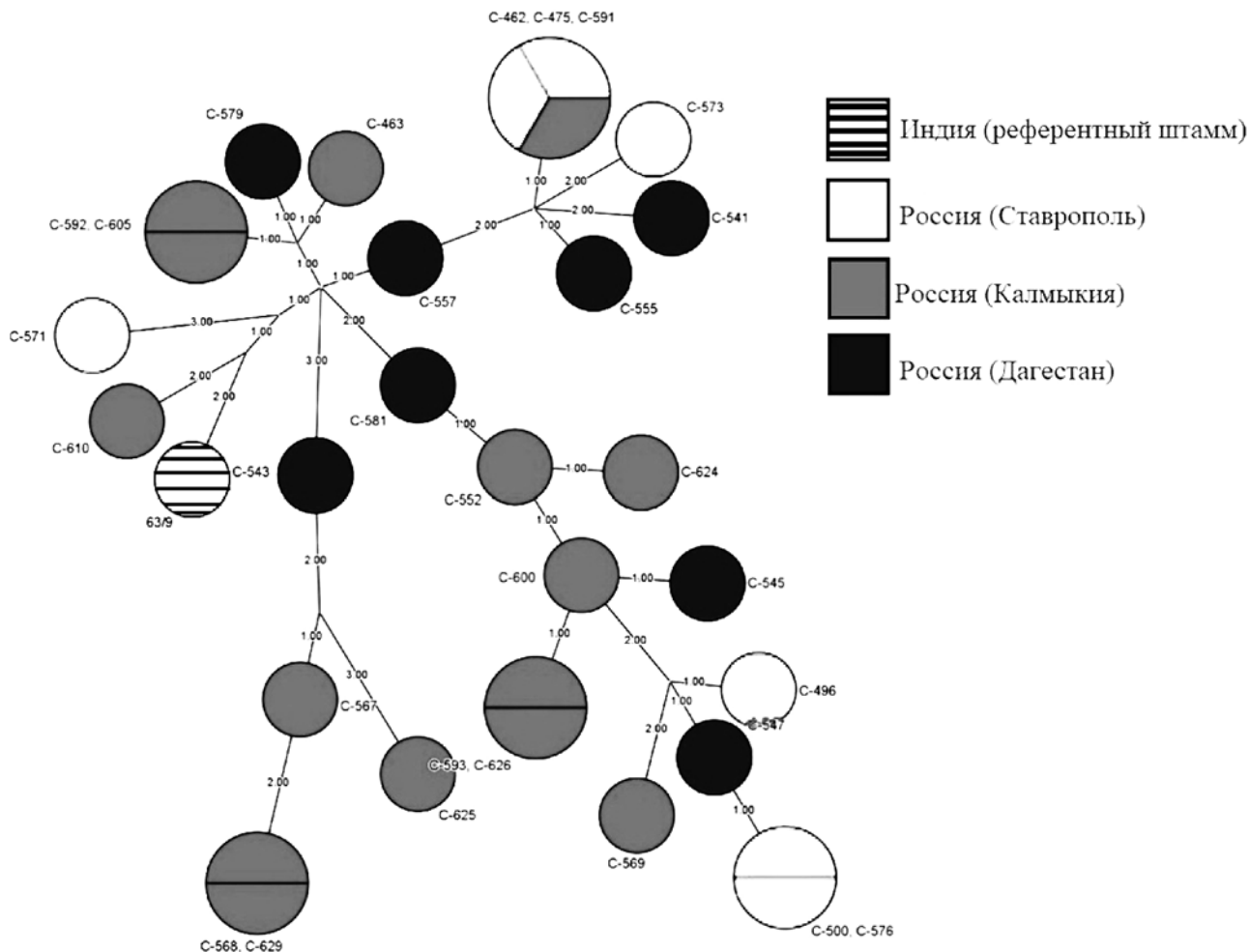


Рис. 1. Дендрограмма *Brucella melitensis*, построенная на основании кластерного анализа данных генотипирования методом MLVA-16, сопоставленная с территорией выделения штаммов

вить выборку штаммов с территорией, на которой они были выделены (Республика Дагестан, Республика Калмыкия, Ставропольский край).

Литература

1. Ковалев Д.А., Мисетова Е.Н., Писаренко С.В., Шакирова Л.И., Ляпустина Л.В., Головнева С.И. Мультилокусное генотипирование возбудителя бруцеллеза методом ПЦР и секвенирования // Методические рекомендации. – Ставрополь: 2012. – 28 с.
2. Кулаков Ю.К., Желудков М.М., Толмачева Т.А., Цирельсон Л.Е. Метод ПЦР в лабораторной диагностике бруцеллеза // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2010. – № 51(2). – С. 29–33.
3. Садикалиева С.О., Строчков В.М., Орынбаев М.Б., Шораева К.А., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р., Султанкулова К.Т. Молекулярно-генетическое типирование бактерии рода BRUCELLA, Циркулирующих в Республике Казахстан // Вестник Башкирского университета. – 2017. – № 2. – С. 403–408.
4. Brucella v4_6 // MLVAbank for Microbes Genotyping URL: <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/57> (дата обращения: 19.10.2022).

Стерин-деградирующая активность и геномная последовательность *Mycolicibacterium smegmatis* ВКМ Ас-1171

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН),
anagoge@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38321

В процессе эволюции у актинобактерий развились специализированные катаболические пути для использования природных стерина в качестве источников углерода и энергии. Модификация этих путей стала основой для производства ключевых предшественников фармацевтических стероидов. В то время как большинство промышленных штаммов относится к видам *Mycolicibacterium neoaurum* или *Mycolicibacterium fortuitum* [1], штамм-деструктор стерина *Mycolicibacterium smegmatis* mc² 155 также признан перспективной платформой для конструирования продуцентов стероидных соединений [2].

В данной работе проведено сравнительное изучение окислительной активности трех штаммов *Mycolicibacterium smegmatis* (mc² 155, ВКМ Ас-1171, ВКМ Ас-1239) в отношении фитостерина, проведено полногеномное секвенирование, сборка и аннотирование генома наиболее активного штамма.

Аэробную деградацию фитостерина (10 г/л) проводили, при температурах 30 или 37 °С в минерально-глицериновой среде TR [3] или в той же среде, дополненной солюбилизирующим агентом – метилированным β-циклодекстрином (МЦД, 56 г/л). Концентрацию стерина и стероидов анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ. Культивирование бактерий и выделение геномной ДНК осуществляли как описано ранее [3, 4]. Библиотеки для высокопроизводительного секвенирования получали с помощью наборов KAPA DNA Library Preparation Kit for Illumina и KAPA Dual-Indexed Adapter Kit (Kapa Biosystems). Секвенирование генома выполняли на Illumina HiSeq 2000 с набором HiSeq SBS Kit v3. Для удаления последовательности адаптеров использовали Trimmomatic 0.39 и собственную программу, написанную на языке Perl (<https://github.com/BraginE/bioinfo>). Сборку генома *de novo* производили с помощью программы Ray 2.3.1, с длиной k-мер 31. Геном аннотировали с помощью Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Расчет средней нуклеотидной идентичности (ANI) проводили с помощью программы ANI calculator.

Все три штамма *M. smegmatis* были способны к деградации фитостерина, однако их активности существенно различались в зависимости от температуры и наличия в среде солюбилизатора. Наибольшую целевую активность в отсутствие экзогенного солюбилизатора стерина проявил штамм Ас-1171

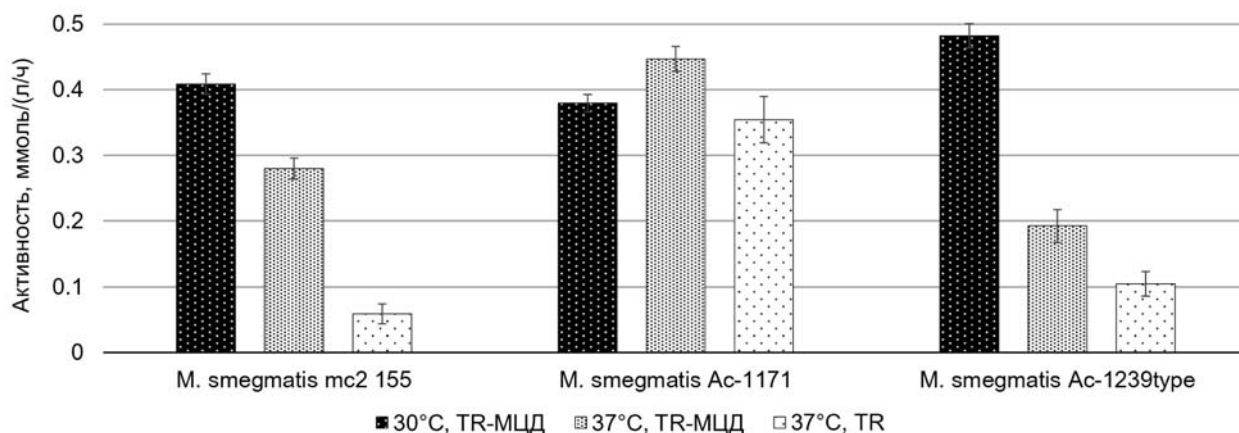


Рис. 1. Стерин-деградирующая активность штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*

(рис. 1), что свидетельствует об эффективном функционировании систем транспорта данных липофильных субстратов. Также Ас-1171 проявлял наибольшую стерин-деградирующую активность при 37 °С в отличие от двух других штаммов. Данные отличия являются преимуществом с точки зрения перспектив использования данного штамма как платформы для генетической инженерии с целью биотрансформации стероидных соединений.

Ранее штамм *M. smegmatis* ВКМ Ас-1171 (=NCIMB 8548 =ССМ 2067) был использован в различных биохимических и микробиологических исследованиях в качестве модельного непатогенного микроорганизма [см., например 5], для проверки метода выделения ДНК и т.п., однако о его способности окислять стерины до сих пор не сообщалось, также не было опубликовано данных о последовательности его генома.

В результате секвенирования генома Ас-1171 получено 19143437 парно-концевых прочтений (2×100). Сборка генома позволила получить 96 контигов общей длиной 7600730 п.н. (покрытие генома 44×, длина N50 199025 п.н., содержание GC 67,5%). Полученные последовательности генома депонированы в базе данных NCBI GenBank (JAMZOD000000000.1).

Среди штаммов *M. smegmatis* с известными последовательностями генома Ас-1171 показал наибольшее сходство с *M. smegmatis* Nishi, тогда как значение ANI между Ас-1171 и *M. smegmatis* mc² 155 было ниже (табл. 1). Размер генома Ас-1171 примерно на 600 тыс. п.н. больше, чем у других штаммов *M. smegmatis*.

Таблица 1

**Средняя нуклеотидная идентичность генома Ас-1171
и некоторых других штаммов *Mycolicibacterium smegmatis***

Штамм	Номер доступа	Размер генома, п.н	ANI
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	CP009494.1	6988269	98,94
<i>M. smegmatis</i> strain Rabinowitchi	CP080272.1	7061747	99,01
<i>M. smegmatis</i> strain Nishi	CP080273.1	7010278	99,09
<i>M. smegmatis</i> strain Jucho	CP080274.1	6895172	98,95

Геном Ас-1171 содержит 7163 гена, кодирующих белки, 57 генов, кодирующих рНК (2, 2, 2, 48 и 3 гена, кодирующих соответственно 5S рРНК, 16S рРНК, 23S рРНК, тРНК и некодирующую рНК) и 167 псевдогенов.

Штамм *M. smegmatis* Ас-1171 обладает полным набором ключевых генов катаболизма стерина, что коррелирует с его способностью к быстрой деградации фитостерина. Полученные результаты вносят вклад в понимание разнообразия и особенностей штаммов *M. smegmatis*, способных к окислительной деградации стерина, и могут быть использованы для конструирования новых штаммов, способных продуцировать ценные стероидные соединения.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 21-64-00024).

Литература

1. Zhao A. et al. 2021. Biotechnol Adv 53:107860.
2. Galán B. et al. 2017. Microb Biotechnol 10:138–150.
3. Dovbnya D. et al. 2017. p. 259–269, Microbial Steroids. Springer New York, New York, NY.
4. Bragin E.Yu. et al. 2013. J Steroid Biochem Mol Biol 138:41–53.
5. Nagachar N., Ratledge C. 2010. FEMS Microbiol Lett 308:159–165.

Разработка новых материалов на основе хитозана для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галерее от микробиологического поражения

Ермолюк А.А.^{1,2}, Авданина Д.А.², Хайрова А.Ш.², Шумихин К.В.³,
Лопатин С.А.², Жгун А.А.²

¹РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, г. Москва,
anya_ermolyuk@mail.ru

²ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, г. Москва

³Государственная Третьяковская галерея, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38322

Сохранение объектов культурного наследия – важнейшая задача, с которой сталкиваются специалисты всего мира. В настоящее время известны характерные группы микроорганизмов, приводящие к разрушению тех или иных материалов, из которых созданы произведения искусства. В условиях музейного хранения наибольшую опасность для произведений темперной или масляной живописи несут плесневые грибы, способные к деструкции этих материалов при локальных отклонениях от поддерживаемого температурно-влажностного режима.

Ранее мы изучили микробиологическое сообщество в залах древнерусской живописи основного здания Государственной Третьяковской галереи (ГТГ, Москва, Лаврушинский переулок, 10). Основных представителей плесневых грибов выделили в чистые линии и показали их способность к деструкции органических материалов, используемых в темперной живописи. Для этого выделенные грибные штаммы инокулировали на специально изготовленные макеты, имитирующие материалы иконы. В результате определили важнейших грибов-деструкторов, потенциально опасных для произведений темперной живописи в ГТГ.

Использование антисептиков для защиты произведений живописи в значительной степени ограничено, по сравнению с их применением во многих других областях. Недопустимо как химическое взаимодействие антисептика с живописными соединениями, так и изменение физических свойств материалов. Кроме того, добавленный антисептик должен быть безопасен для реставраторов и посетителей музея. Дополнительные знания, которые получили в последние годы, привели к тому, что количество разрешенных для применения антисептиков, значительно сократилось. Один из наиболее распространенных и разрешенных для применения в живописи антисептиков, Катамин АБ, в значительной мере теряет свою активность в составе таких материалов. В этой связи актуальной задачей является поиск антисептиков нового поколения для их возможности применения в составе живописных материалов. Ранее мы разработали группу перспективных соединений, таргетированных против грибов-деструкторов в ГТГ, на основе алкилнуклеозидов [1] и хитозана, полученного из краба [2].

Наша работа посвящена характеристике антифунгальных свойств нового материала на основе хитозана, полученного из личинок насекомого *Hermetia illucens* (муха Чёрная львинка). Недавно показали, что этот вариант хитозана в ряде случаев демонстрирует более высокую активность против микроорганизмов, чем хитозан, выделенный из краба [3]. Несмотря на то, что хитозаны, выделяемые из различных источников имеют сходную полисахаридную структуру, ассоциация хитина с различными белками и другими органическими молекулами может приводить к различным модификациям.

Противогрибковую активность низкомолекулярных хитозанов (НМХ) с молекулярной массой (ММ) 33, 36, 39, 53 и 88 кДа из *H. illucens* изучили в сравнении с 25 и 47 кДа хитозанами, полученными из краба, которые ранее показали наибольшую активность среди изученных НМХ [2]. Для положительного контроля использовали антисептик Катамин АБ. Для определения противогрибковой активности в качестве тест-культур использовали 12 штаммов плесневых грибов, относящихся к Аскомицетам и Зигомицетам, для которых ранее была продемонстрирована способность повреждать лакокрасочные материалы, используемые в произведениях темперной живописи в ГТГ [4]. Эффективность ингибиро-

вания сравнивали по отношению радиального роста грибных колоний на агаризованной среде Чапека-Докса с добавлением хитозанов к росту на контрольной среде (без добавок). Эксперимент проводили в течение 42 суток после инокуляции тест-культур на опытные и контрольные агаризованные среды, измерения проводили каждые 3 дня. Такой дизайн эксперимента позволил определить динамику ингибирования роста при добавлении того или иного хитозана, а также сравнить силу воздействия изучаемых антисептиков.

Оказалось, что активность хитозанов из *H. illucens* в целом возрастает в ряду от 33 до 88 кДа. При этом наибольшая активность соответствует хитозану с ММ 33 кДа, а наименьшая активность – хитозану с ММ 88 кДа. В этом ряду выпадает эффективность ингибирования, продемонстрированная хитозаном с ММ 36 кДа, примерно соответствующая уровню ингибирования хитозана с ММ 88 кДа. Для того чтобы разобраться в этом феномене определили второй важнейший параметр, который влияет на антимикробные свойства хитозанов, СДА. Оказалось, что у используемого в нашем эксперименте хитозана с ММ 36 кДа в результате химического гидролиза СДА была ниже, чем у остальных хитозанов. Возможно, это послужило основным фактором, который привел к снижению антимикозных свойств. Наиболее эффективные хитозаны с ММ 33 и 39 кДа из *H. illucens* в целом проявили одинаковый профиль ингибирования с хитозанами, полученными на основе крабового панциря (с ММ 25 и 47 кДа). Ранее в эксперименте с «крабовыми» хитозанами показали, что в ряду 6-12-18-25-45 кДа на агаризованной среде Чапека-Докса наиболее активно подавляют рост хитозаны с ММ 25 и 45 кДа [2]. Причем демонстрировалась «перекрестная» эффективность, рост одних тест-культур эффективнее подавлялся 25 кДа, других – 45 кДа хитозанами, однако рост всех тест-культур значительно хуже ингибировался «крабовым» хитозаном с ММ 18 кДа; уровень ингибирования падал еще сильнее с уменьшением ММ до 12-ти и 6 кДа. В нашем эксперименте проследили обратную тенденцию, в ряду от 33 до 88 кДа. Наиболее эффективными оказались хитозаны с ММ 33 и 39 кДа (36 кДа выпал из эксперимента), далее эффективность ингибирования падала к 53 кДа и еще сильнее к 88 кДа.

Вывод

Можно сделать вывод, что хитозан, полученный из *H. illucens*, как и крабовый хитозан, может служить перспективным материалом для защиты объектов изобразительного искусства, поскольку демонстрирует близкие защитные свойства против грибов-деструкторов изобразительных материалов. Возможно, в ряду низкомолекулярных хитозанов, получаемых методом химического гидролиза, с ММ от 6 до 88 кДа, существует параболическая зависимость между молекулярной массой хитозанов и эффективностью ингибирования, с максимальным уровнем ингибирования от 25 до 47 кДа и минимальными значениями в районах 6-ти и 88 кДа. Поскольку для различных грибных штаммов максимум ингибирования приходится на различные значения внутри ряда 6–88 кДа, суммарный максимум размыт в диапазоне от 25–47 кДа. В связи с этим, при создании эффективного ингибитора широкого спектра действия наиболее действенным видится коктейль из различных хитозанов, одними из компонентов которого могут служить изученные в нашей работе хитозаны из *H. illucens*, с ММ 33 и 39 кДа.

Литература

1. Alexandrova L.A. et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides // New J. Chem. The Royal Society of Chemistry, 2022. Vol. 46, № 12. P. 5614–5626.
2. Zhgun A.A. et al. Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15th–16th Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // Microbiol. (Russian Fed. 2020. Vol. 89, № 6. P. 750–755.
3. Khayrova A. et al. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan // Molecules. 2022. Vol. 27, № 2. P. 577.
4. Zhgun A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. 2020. Vol. 15, № 4. P. 1–20.

Бактериальный белок MF3: возможные механизмы его защитного действия против вируса табачной мозаики и рост-стимулирующих эффектов

Ерохин Д.Е., Щербакова Л.А., Эммер Д.Я., Чудакова К.А., Джавахия В.Г.

Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Большие Вяёмы, Московская область,
dzhavakhiya@yahoo.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38323

Интенсивное использование синтетических пестицидов позволило в течение последних десятилетий значительно снизить потери от болезней продукции растениеводства в сельском хозяйстве. Однако обработка промышленных посевов сельскохозяйственных культур химическими пестицидами приводит к их накоплению в продукции, собранной с обработанных полей, а также к попаданию данных ксенобиотиков в почву и водоемы. Одним из возможных подходов к снижению нагрузки чужеродных для окружающей среды средств защиты от болезней в агроценозах является применение биогенных индукторов системной устойчивости (СУ) растений. Одним из таких биогенных индукторов является выделенный из рост-стимулирующей бактерии *Pseudomonas fluorescens* белок MF3, который относится к бактериальным пептидил-пролил-цис/транс-изомеразам (PPI-азам) FKBP-типа [1]. Структура MF3 и кодирующего этот белок гена были определены [2] и защищены патентами в России и других странах. Надежный защитный эффект MF3 против фитовирусов, фитопатогенных грибов и бактерий подтвержден результатами вегетационных опытов и полевых испытаний на табаке, картофеле, пшенице и других культурах. Однако, молекулярные события, происходящие в растениях в ответ на обработку этим белком-индуктором, в том числе те, что повышают устойчивость сельскохозяйственных культур к вирусным заболеваниям, остаются неизученными.

В связи с этим мы предприняли попытку исследовать влияние MF3 на экспрессию генов табака (с. Xanthi NN), ассоциированных с его СУ к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Кроме того, мы попытались оценить возможность управления защитным эффектом MF3 путем изменения структуры его активного центра (АЦ), применяя метод аланинового сканирования [3] и эвристический метод с использованием двух правил подбора точечных аминокислотных замен, приводящих к снижению функциональной активности белков: поиск уникальных аминокислот в семействе белков с известной третичной структурой и замена на пролин аминокислот в составе α -спиралей вторичной структуры белка [4]. Мы также исследовали влияние MF3 на развитие и метаболизм обработанных им растений пшеницы.

Данные, полученные при исследовании влияния MF3 на экспрессию генов табака, ассоциированных с его СУ к ВТМ, свидетельствуют о том, что данный белок способен активировать экспрессию супероксиддисмутазы (SOD) – одного из ключевых ферментов антиоксидантной системы растений. Так, установлено, что уровень экспрессии SOD в обработанных белком растениях был в 5 раз выше, чем в контрольных.

С помощью аланинового сканирования получено 13 мутантов с последовательной заменой на аланин всех неалифатических аминокислот в составе АЦ MF3. Биотесты с обработкой ими растений табака показали, что некоторые из этих мутантных белков имеют различную защитную активность. Вторичная структура АЦ MF3 была предсказана с использованием алгоритма JNET (рис. 1А). Для поиска уникальных аминокислот АЦ MF3 было произведено выравнивание первичных последовательностей участков белков семейства PPI-аз с известной кристаллической структурой и значением $GQME \geq 0.70$ в области гомологичной АЦ MF3 с использованием ресурса сервера Swissmodel (swissmodel.expasy.net) (рис. 1Б). Результаты эвристического подхода позволяют предположить, что наиболее перспективной для управления индуцирующей активностью MF3 и получения его мутантов с измененным АЦ является замена уникального лизина в альфа-спирали на пролин (NIIPGLEK->PALEGKAVGDDLEVVPEPEDAYGE), которая отвечает обоим правилам указанного подхода.

JNET

1 IIPGLEKAVGDDLEVAVEPEDAYG 29
 CCCHHHHHHHCCCCCCEEEEECCCCCCC
 22436776636677981467752899989

A

Templates	Quaternary	Structure	Sequence	Similarity
⚙ Target	N IIPGLEK ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			30
4odm.3.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
7oxk.1.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
2k8i.1.A	N IIPGLE ALEG VGD VAV ANDAYG			70
4odm.2.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
4odm.4.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
4odm.1.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
4odl.2.A	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
3luo.2.C	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
3cgm.2.D	N IIPGLE ALEG G E AAYG			65
3prb.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82
3prb.1.B	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82
2kfw.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD VAV ANDAYG			70
3jym.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			345
3pra.1.B	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82
3pra.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82
3pr9.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82
3jym.2.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			345
4dt4.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			93
1q6h.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			202
3kz7.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			95
2mph.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			200
7dek.2.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			183
7dek.2.B	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			183
Б 3prd.1.A	N IIPGLE ALEGR VGD DLEV -VEPEDAYGE			82

Рис. 1. Алгоритм JNET (A) и выравнивание первичных последовательностей участков белков семейства PPI-аз с известной кристаллической структурой (Б).

A – выделенные области соответствуют предполагаемой структуре α -спирали; Б – горизонтальными овальными рамками выделены области α -спиралей, вертикальными – уникальные аминокислоты в составе АЦ MF3

В ходе вегетационных опытов было обнаружено, что MF3 обладает способностью стимулировать рост и улучшать состояние растений пшеницы при неблагоприятных для вегетации условиях. Так, предпосевное замачивание семян яровой пшеницы (с. Дарья и с. Злата) в водных растворах этого белка (100 мкг/мл) и последующее послевсходовое опрыскивание той же дозой MF3 ее проростков, стимулировали их развитие, способствовали увеличению числа продуктивных (колосоносных) стеблей и размера колоса растений. Кроме того, обработка семян раствором белка MF3 приводила к увеличению средней массы сухого вещества растения на одну треть по сравнению с контролем. Результаты этих вегетационных экспериментов позволили выдвинуть предположение о возможной связи рост-стимулирующих эффектов MF3 с его влиянием на фотосинтез. Чтобы установить, оказывает ли обработка белком MF3 такое влияние, растения пшеницы (с. Злата), выращенные в контролируемых условиях ($11 \cdot 10^3$ лк, 16-часовой световой период, $\phi = 60\%$, 22–24 °C) до стадии кущения (Z21-25), опрыскивали раствором MF3 (100 мкг/мл H₂O, 15 мл/растение) и через 2 и 10 суток после обработки определяли скорость ассимиляции CO₂, а также скорость транспирации и устьичную проводимость у обработанных и контроль-

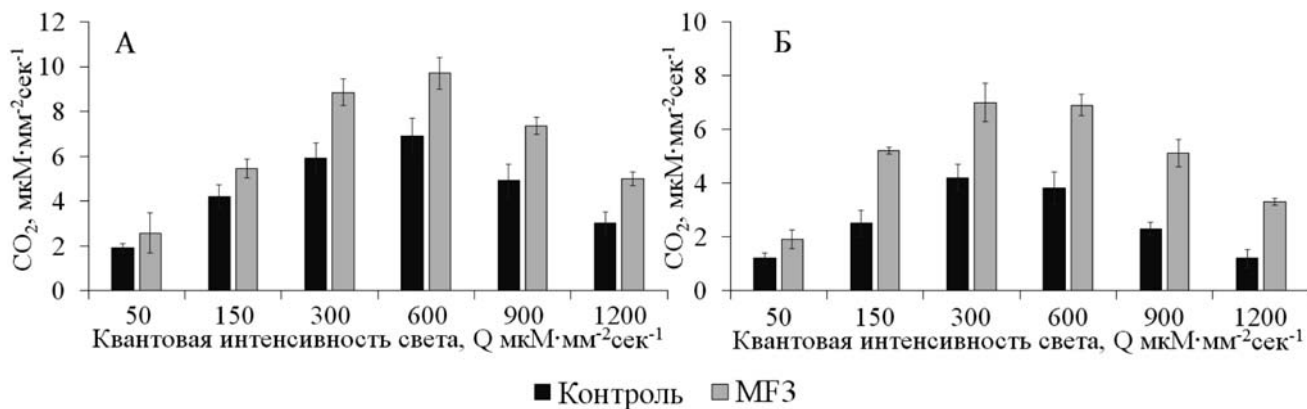


Рис. 2. Влияние бактериального белка-индуктора MF3 на скорость ассимиляции атмосферного углекислого газа растениями пшеницы через 2 (А) и 10 (Б) суток после их обработки

ных (опрыскивание водой) растений, используя для анализа процессов фотосинтеза портативную систему LI-6800 (LI-COR, США). Результаты этих экспериментов показали, что скорость ассимиляции CO_2 у обработанных MF3 растений в среднем возрастает в 1,5–2,0 раза, по сравнению с контролем, на 2 и 10 сутки после опрыскивания соответственно (рис. 2).

В то же время MF3 в испытанной концентрации не оказывал влияния на транспирацию и не снижал устьичную проводимость, вследствие чего его использование не приводило к ухудшению тургора листьев, что нередко наблюдается при применении химических средств, например гербицидов [5].

Полученные данные подтверждают целесообразность дальнейших исследований молекулярных механизмов защитного действия MF3 против других фитопатогенных вирусов, а также грибов и бактерий. Они также свидетельствуют о том, что защитные препараты, которые могли бы быть созданы на его основе, будут способствовать фотосинтетическим процессам и улучшению состояния обработанных растений. Можно ожидать, что способность этого бактериального белка индуцировать СУ в сочетании с его положительными физиологическими эффектами обеспечит полноценную реализацию потенциальной продуктивности сельскохозяйственных культур и приведет к существенному повышению их урожая.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00154), за исключением вегетационных экспериментов по оценке влияния белка MF3 на развитие и фотосинтез растений, выполненных в рамках государственного задания № 0598-2019-0002.

Литература

1. Shumilina D., Krämer R., Klocke E., Dzhavakhiya V. MF3 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) – an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens. *Phytopathologia Polonica*, 2006, 41: 39–49.
2. Dzhavakhiya V., Filipov A., Skryabin K., et al. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests. Patent PCT WO2005/061533 A1, 2005-07-07.
3. Morrison K.L., Weiss G.A. Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol.*, 2001, 5(3): 302–307.
4. Раменский В.Е. Влияние точечных аминокислотных замен на структуру и функции белков: дисс. канд. физ-мат. наук. Москва, 2001, РГБ ОД, 61 01-1/833-0.
5. Beerling D.J. Gas valves, forests and global change: a commentary on Jarvis (1976) ‘The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field’. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015, 19, 370(1666): 20140311.

Ключевая роль активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны грибов в продукции вторичных метаболитов

Жгун А.А.¹, Думина М.В.¹, Валиахметов А.Я.², Эльдаров М.А.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва, zzhgun@mail.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38324

H^+ -АТФаза плазматической мембраны Р-типа (РМА) играет важную роль в физиологии мицелиальных грибов [1]. Этот протонный насос генерирует электрохимическую протонно-движущую силу через мембрану, которая управляет энергозависимым поглощением аминокислот, сахаров, нуклеозидов и неорганических ионов [2], а также экспортом вторичных метаболитов (ВМ) [3]. Кроме того, транспорт H^+ , опосредованный этим ферментом, способствует регуляции внутриклеточного и поверхностного рН вдоль гиф [4]. Работа бета-лактамовых транспортеров также зависит от трансмембранного протонного потенциала, генерируемого в результате РМА-активности [5]. Ранее мы показали, что улучшенный классическими методами продуцент антибиотика цефалоспорина С, штамм *Acremonium chrysogenum* НУ, имеет сниженную РМА-активность, примерно 2 раза, по сравнению с исходным штаммом дикого типа *A. chrysogenum* WT [6]. Наряду со значительным увеличением выхода цефалоспорина С, в 200–300 раз, у *A. chrysogenum* НУ в процессе улучшения произошли дополнительные физиологические изменения, выражающиеся в общем снижении жизнеспособности и стрессоустойчивости, включая заметное замедление скорости роста на плотных и жидких питательных средах [7], что может быть обусловлено снижением активности РМА [8]. У *A. chrysogenum* НУ не обнаружили изменения на уровне аминокислотной последовательности РМА1 (GenBank No: QDF45217.1, [3]) по сравнению с исходным штаммом дикого типа (GenBank No: KFН44673.1, [10]). Однако в процессе ферментации экспрессия РМА у высокоактивного штамма даунрегулирована, в 2–5 раз. В связи с этим одним из подходов для увеличения продукции цефалоспорина С у *A. chrysogenum* НУ виделось в повышении его жизнеспособности через увеличение РМА-активности.

В нашей работе мы увеличили РМА-активность у *A. chrysogenum* НУ за счет введения дополнительной копии гетерологичного гена *PMA1* из *Saccharomyces cerevisiae*. Нам удалялось получить серию рекомбинантных клонов *A. chrysogenum* НУ/*PMA1_{sc}* с последовательно увеличивающейся РМА-активностью, от ее уровня у *A. chrysogenum* НУ для ее уровня у *A. chrysogenum* WT и немного выше. Правильную интеграцию дрожжевой РМА1 в плазматическую мембрану мицелиального гриба *A. chrysogenum*, относящегося к классу сордариоциметов, показали в результате присоединения к последовательности *PMA1_{sc}* гена желтого флуоресцентного белка (*tagYFP*) с 3'-конца. Способность такого гибридного белка РМА1_{sc}-*tagYFP* эффективно выполнять свои функции предварительно продемонстрировали в рекомбинантном штамме *S. cerevisiae* SY4/*PMA1_{sc}-tagYFP* (несущим дополнительную копию *PMA1* в составе центромерного вектора) на фоне глюкозной инактивации исходной хромосомной копии *PMA1*, находящейся в штамме *S. cerevisiae* SY4 под промотором, репрессируемым глюкозой [3]. Для этого одновременно с глюкозной инактивацией экспрессии *PMA1*, проводили термоактивацию кассеты экспрессии *PMA1_{sc}-tagYFP*, находящейся под контролем термоиндуцибельного промотора *2HSE*, в результате теплового шока. Характерное для гибридных белков РМА1 с цветными флуоресцентными белками «рафтовое» свечение [9] также наблюдали в штамме *S. cerevisiae* YPH857/*PMA1_{sc}-tagYFP*, где целевую кассету экспрессировали под контролем *TEF1* промотора из *Ashbya gossypii*. Способность РМА1_{sc}-*tagYFP* сопрягаться с CefT, MFS-транспортером бета-лактамов из *A. chrysogenum*, показали в штамме *S. cerevisiae* YPH857/*PMA1_{sc}-tagYFP/ CefT_{ac}-tagYFP*.

В результате получили неожиданные результаты. Оказалось, что увеличение РМА-активности у *A. chrysogenum* НУ коррелирует со снижением продукции цефалоспорина С. При этом наблюдали пропорциональную зависимость между увеличением РМА-активности и снижением выхода цефалоспори-

на С. При повышении РМА-активности на 50%, снижение в продукции цефалоспорина С составляло 15–20%, дальнейшее увеличение РМА-активности до 100% и выше приводило к снижению выхода цефалоспорина С до 90%, а фракции мажорных цефемов (дезацетилцефалоспорин С и цефалоспорин С) до 50%. Для объяснения полученных результатов изучили содержание АТФ у *A. chrysogenum* НУ и его рекомбинантных аналогов. Ранее было показано, что у *A. chrysogenum* НУ содержание АТФ снижено, в 3–4 раза по сравнению с исходным штаммом *A. chrysogenum* WT [6]. Оказалось, что в наших экспериментах экспрессия дополнительной копии *PMAI_{sc}* под контролем конститутивного промотора *gpdA* из *Aspergillus nidulans* приводит к дополнительному снижению уровня клеточного АТФ [3]. Причем снижение АТФ в серии рекомбинантных клонов четко коррелирует в увеличением РМА-активности. У клона АсPS10, для которого наблюдали увеличение РМА-активности до уровня 110–120% от уровня в штамме дикого типа (и в два раза по сравнению с *A. chrysogenum* НУ), снижение АТФ было наибольшим, почти в 10 раз по сравнению с штаммом дикого типа (и более чем в два раза по сравнению с *A. chrysogenum* НУ). После проведения корреляционного анализа между содержанием АТФ, цефалоспорина С и РМА-активностью в штаммах *A. chrysogenum* НУ и вариантах *A. chrysogenum* НУ/*PMAI_{sc}* показали взаимосвязь между этими тремя переменными. Предложили модель, описывающую пересечение биосинтеза цефалоспорина С и работы РМА на уровне потребления общего субстрата АТФ. Также отдельно изучили последнюю стадию биосинтеза цефалоспорина С, связанную с потреблением АТФ. Показали корреляцию между содержанием компонентов фракции мажорных цефемов, количеством АТФ и РМА-активностью клетки. При снижении АТФ в рекомбинантных клонах до определенного порогового уровня, который оказался равным ~60% от содержания АТФ у *A. chrysogenum* НУ, происходит резкое снижение цефалоспорина С и накопление его предшественника на фоне общего падения фракции этих мажорных для *A. chrysogenum* цефемов.

Для того чтобы определить молекулярные основы полученного феномена, изучили изменение экспрессии генов биосинтетических кластеров (BGCs) бета-лактамов в процессе ферментации *A. chrysogenum* НУ и его рекомбинантных аналогов (0 ч, 48 ч и 120 ч). Оказалось, что биосинтетические гены «ранних» и «поздних» бета-лактамов BGCs (*pcbAB*, *pcbC*, *cefD1*, *cefEF* и *cefG*), как и *cefR*, ген путь-специфического регулятора бета-лактамов, в целом даунрегулированы у рекомбинантных *A. chrysogenum* НУ/*PMAI_{sc}* по сравнению с исходным высокоактивным штаммом. Причем уровень даунрегуляции тем сильнее, чем больше увеличена РМА-активность. Наряду с этим у рекомбинантных клонов апрегулированы транспортные гены (*cefP*, *cefM* и *cefT*), уровень продукции эндогенной копии *PMA* не изменен.

Наши данные показали, что дополнительное увеличение РМА-активности у высокоактивного продуцента цефалоспорина С приводит к снижению его продукции. Грибная РМА является основным потребителем АТФ клетки, который также используется для биосинтеза цефалоспорина С. Возможно, сниженная РМА-активность у *A. chrysogenum* НУ является спутывающим событием, отобранном в процессе улучшения штамма, которое позволило перенаправить часть АТФ, используемого РМА на нужды целевого биосинтеза.

Литература

1. Burgstaller W. Transport of Small Ions and Molecules through the Plasma Membrane of Filamentous Fungi // Crit. Rev. Microbiol. 1997. Vol. 23, № 1. P. 1–46.
2. Ambesi A. et al. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. // J. Exp. Biol. 2000. Vol. 203, № Pt 1. P. 155–160.
3. Zhgun A. et al. The critical role of plasma membrane H⁺-ATPase activity in cephalosporin C biosynthesis of *Acremonium chrysogenum* // PLoS One. 2020. Vol. 15, № 8 August.
4. Kane P.M. Proton Transport and pH Control in Fungi. // Adv. Exp. Med. Biol. NIH Public Access, 2016. Vol. 892. P. 33–68.
5. Palmgren M., Morsomme P. The plasma membrane H⁺-ATPase, a simple polypeptide with a long history // Yeast. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 36, № 4. P. 201–210.
6. Valiakhmetov A.Y. et al. The concentration dynamics of inorganic polyphosphates during the cephalosporin C synthesis by *Acremonium chrysogenum* // Appl. Biochem. Microbiol. SP MAIK Nauka/Interperiodica, 2010. Vol. 46, № 2. P. 184–190.
7. Zhgun A.A. et al. Genetic transformation of the mycelium fungi *Acremonium chrysogenum* // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. Vol. 44, № 6. P. 600–607.

8. *McCusker J.H., Perlin D.S., Haber J.E.* Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol.* American Society for Microbiology, 1987. Vol. 7, № 11. P. 4082–4088.
9. *Malinská K. et al.* Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. Vol. 14, № 11. P. 4427–4436.
10. *Terfehr D. et al.* Genome Sequence and Annotation of *Acremonium chrysogenum*, Producer of the β -Lactam Antibiotic Cephalosporin C. // *Genome Announc.* 2014. Vol. 2, № 5. P. e00948-14-e00948-14.

Характеристика некоторых коммерческих пробиотических штаммов дрожжей *Saccharomyces* и выделенных в Болгарии новых штаммов молочнокислых бактерий

Жучкина Н.И.¹, Кокорева А.Н.^{1,2}, Колтовая Н.А.¹

¹Объединенный институт ядерных исследований,
gem_nadin@bk.ru

² Государственный университет «Дубна»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38325

Исследования последних лет показали, что пробиотики способны предотвращать неблагоприятные изменения в микробиоме людей, подвергающихся длительному воздействию ионизирующего излучения. В связи с этим пробиотики находят применение в лучевой терапии и лечении рака, а также в космической медицине [1]. При этом возникает необходимость расширения тестируемых характеристик и более комплексного изучения свойств используемых пробиотических штаммов.

В данной работе мы анализировали свойства пробиотических штаммов дрожжей *Saccharomyces boulardii*, изолированных из коммерческих препаратов Энтерол (Biocodex, Франция) (Sb-B) и Cosmo-tentic (Puratos, Бельгия) (Sb-P), одного лабораторного штамма *Saccharomyces cerevisiae* 711a (*MATa ade2*), а также трёх штаммов молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus* sp. из коллекции Института микробиологии БАК (Болгария, София) – Ls2, Ls4, Ls8, любезно предоставленные нам д-ром Светлой Дановой.

Филогенетически *S. boulardii* относятся к *S. cerevisiae*, особое название сохранилось только для коммерческих штаммов. Для сравнения коммерческих и лабораторных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* и *S. boulardii* на уровне ДНК, мы провели амплификацию интронов на амплификаторе T100 ThermalCycler (BioRad) с использованием праймеров, локализованных в сайтах сплайсинга интронов. Анализ показал, что большинство амплифицированных фрагментов штамма 711a присутствовало и в пробиотических штаммах, что подтверждает генетическую соответствие между ними. Однако наблюдались отличия между *S. cerevisiae* и *S. boulardii*, а также отличия между обоими штаммами пробиотиков: у штамма Sb-P наблюдали несколько специфических амплифицированных фрагментов, отсутствующих у Sb-B.

Проводились исследования ростовых характеристик *S. cerevisiae* и *S. boulardii* в различных условиях, в частности способность клеток к росту при температурах 30° и 37 °С (температура тела человека). Штаммы выращивали на ротационном шейкере (200 об/мин) в среде YPD, концентрацию клеток оценивали по оптической плотности при 600 нм. Существенной разницы между ростом штаммов при 30° и 37 °С мы не наблюдали, хотя штамм Sb-P рос в ~1,2 раза быстрее при обеих температурах. Мы исследовали также и жизнеспособность клеток в модельных условиях желудочной и кишечной среды при росте культуры в течение 60 мин при температуре 37 °С (с добавлением в среду пепсина и панкреатина соответственно). Мы не заметили существенного влияния данных ферментов на жизнеспособность изученных штаммов. Таким образом, наши штаммы способны выжить при прохождении желудочно-кишечного тракта, но из-за более короткого времени генерации Sb-P представляется более предпочтительным в использовании в качестве пробиотика. Изученные нами штаммы по своим характеристикам отличаются в положительную сторону от другого коммерческого препарата [2].

Поскольку перспективным является использование рецептурных составов, изучали взаимодействие дрожжей с лактобактериями, для этого клетки штамма бактерий Ls4 растили в среде MRS, осаждали и отфильтрованную фазу добавляли в среду с растущими дрожжевыми клетками. Исследовали воздействие молочнокислых бактерий на рост дрожжевых клеток штамм 711a при температурах 30 и 37 °С. Показано, что существенной разницы в скорости роста между культурами в жидкой среде YPD, в YPD с добавлением среды для культивирования лактобактерий MRS, а также в YPD с добавлением супернатанта не наблюдалось. Отличия проявлялись только на поздних стадиях культивирования. Наблюдался заметное снижение эффективности спустя 40 часов роста клеток в среде с добавлением супернатанта примерно в 1,3–1,5 раз при обеих температурах. Отличий в росте при добавлении чистой MRS не наблюдалось.

Поскольку планируется использовать пробиотики в космической медицине изучали влияние облучения на свойства пробиотиков. Культуры клеток облучали высокоэнергетическими протонами на клинической протонной установке Медико-технического комплекса в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ. Клетки облучали немодифицированными протонными пучками с энергией 150 МэВ (ЛПЭ 0,54 кэВ/мкм) в дозах от 5 до 20 Гр. Облучение рентгеновским излучением проводили на рентгеновском облучателе CellRad (Precision-X-ray, США) в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ (130 кВ, 5 мА) в дозах 25–300 Гр. Облученные в эппендорфах ночные культуры клеток 711a, Sb-B и Sb-P рассеивали на чашки Петри. Из рис. 1-а видно, что выживаемость двух пробиотических штаммов не менялась в исследуемом диапазоне доз и для них существенно не различалась, а выживаемость 711a снижалась примерно в 1,2 раза при максимальной используемой дозе. При облучении рентгеновским излучением наблюдали схожую картину: выживаемость лабораторного штамма была ниже выживаемости пробиотических штаммов.

Клетки штаммов молочнокислых бактерий Ls2, Ls4, Ls8 также облучали в жидкой среде и осуществляли глубинный посев. Облучение протонами штамма Ls4 в дозах до 20 Гр не давало какого-либо видимого эффекта, выживаемость сохранялась на уровне ~100%. При облучении рентгеновским излучением в дозах до 300 Гр выживаемость всех трех штаммов Ls2, Ls4, Ls8 не отличалась и при максимальной дозе составляла около 25%.

Для анализа воздействия молочнокислых бактерий на выживаемость дрожжевых штаммов при облучении рентгеновскими лучами культуру лабораторного штамма 711a облучали в эппендорфах в жидкой среде YPD, в YPD с добавлением чистой среды MRS и в YPD с добавлением фильтрованной среды MRS, в которой росли клетки штамма Ls4. В дозах до 300 Гр каких-либо существенных различий не выявлено. Следовательно, продукты метаболизма Ls4 не оказывают негативного влияния на жизнеспособность клеток дрожжей 711a, и эти два штамма способны сосуществовать в одной среде.

Таким образом, пробиотические штаммы дрожжей *S. boulardii* существенно отличаются от лабораторного штамма *S. cerevisiae* по ряду характеристик, таких как радиочувствительность и чувствитель-

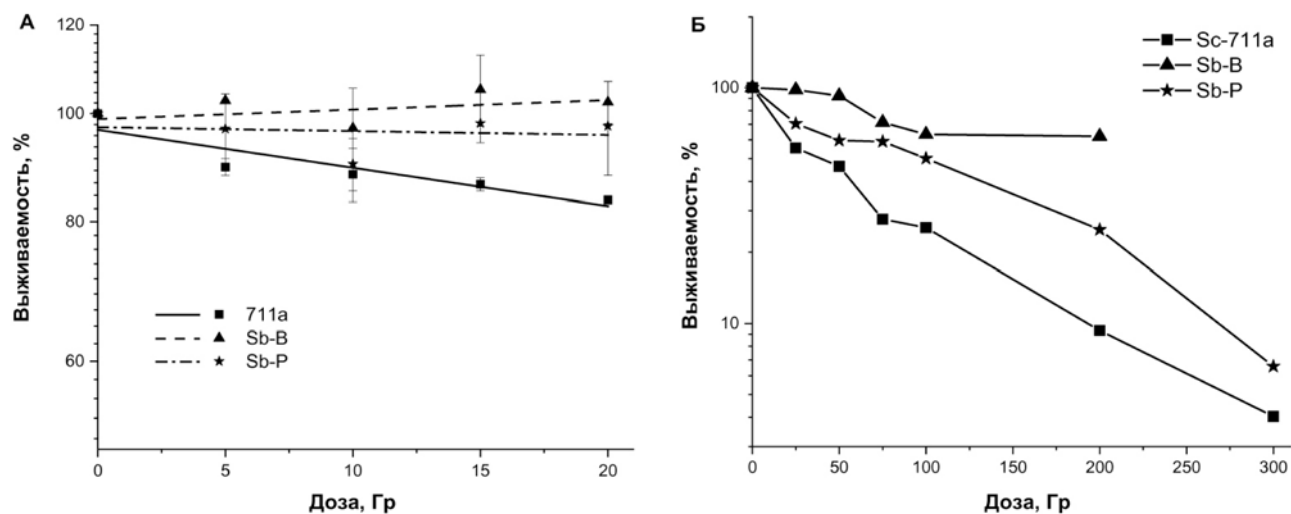


Рис. 1. Выживаемость дрожжевых штаммов 711a, Sb-B и Sb-P при облучении протонами (А) и X-лучами (Б)

ность к антибиотикам (данные не приведены), важных для микроорганизма, который в перспективе может быть использован в качестве пробиотика в космической медицине.

Литература

1. Pop O.A., et al. Biodetoxification and Protective Properties of Probiotics. *Microorganisms*. 10: 1278 (2022).
2. Fietto J.L.R., et al. *Can. J. Microbiol.* 50: 615–621 (2004).

Связано ли голодание дрожжей *Candida maltosa* с апоптозом?

Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Валиахметов А.Я., Дмитриев В.В.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
dmitrievbpm@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38326

Принципиальным моментом в наших исследованиях было обнаружение каналов в клеточной стенке у дрожжей *Candida maltosa* ВКМ Y-2359 в условиях голодания. Было отмечено, что в процессе голодания соотношение «живых и мертвых» клеток при окраске Dead/Life Yeast Cell стабильно неизменно. Возможно, что каналы и их экзоцеллюлярные компоненты с иммобилизованными ферментами участвуют в деструкции продуктов лизиса «мертвых» клеток для поддержания жизнеспособности «живых» клеток. Было сделано предположение, что мы наблюдаем программируемую клеточную гибель, т.е. апоптоз.

Дрожжевые клетки могут гибнуть как при воздействии крайне жёстких условий микроокружения через случайную гибель клеток (ACD – Accidental cell death), так и при ответе на умеренный стресс через регулируемую гибель клеток (RCD – Regulated cell death). Тогда как ACD всегда идёт через некротический морфотип (уничтожение структур клетки, разрывы в плазматической мембране), RCD может проявлять целый спектр морфологий и быть результатом разных сигнальных путей, включая регулируемый некроз или апоптоз. Программируемая гибель клеток (PCD) происходит строго в физиологических сценариях, (например, в ходе развития), и предположительный ответ по аннексину V, выход фосфатидилсерина на наружный слой плазмалеммы представляет собой специфический тип RCD. Возможная роль аутофагии как пути гибели клеток остаётся неясной, тогда как её цитопротективные свойства хорошо известны.

Для проверки этого предположения были проведены некоторые рекомендуемые тесты.

Фиксация с применением KMnO_4 позволила выявлять целостность мембран ядра и митохондрий у голодающей популяции и одновременно выявить патологические нарушения в структуре этих оргanelл. Это свидетельствует в пользу регулируемой клеточной гибели, исключая ACD некрозы (рис. 1). Электронная микроскопия методом сверхбыстрой криофиксации и последующим замещением воды ацетоном с фиксатором OsO_4 позволило увидеть начальный процесс конденсации хроматина в ядре, которое говорит о начале апоптических процессов в клетке (рис. 1б) Также конденсация хроматина была обнаружена с помощью флуоресцентной микроскопии (окраски ядер DAPI) в некоторых клетках популяции (рис. 1в).

Как видно из рис. 2 падение оптической плотности прекращается на 20 часах и далее медленно уменьшается к 200 часу. Процент Pi^+ (мертвых) клеток становится стабильным к 90 часам и плавают в пределе 30% от общего числа клеток в популяции.

Это говорит о том, что, скорее всего мы наблюдаем RCD, т.к. при медленном падении общего числа клеток соотношения живых к мертвым остается стабильно неизменным. Тогда как при некрозе увеличивалось бы количество мертвых клеток в популяции при таком же медленном падении общего числа клеток в популяции. Также начальное повышение оптической плотности, отображенное на графике, при переносе культуры в условия голодания по углероду совпадает с началом формирования каналов

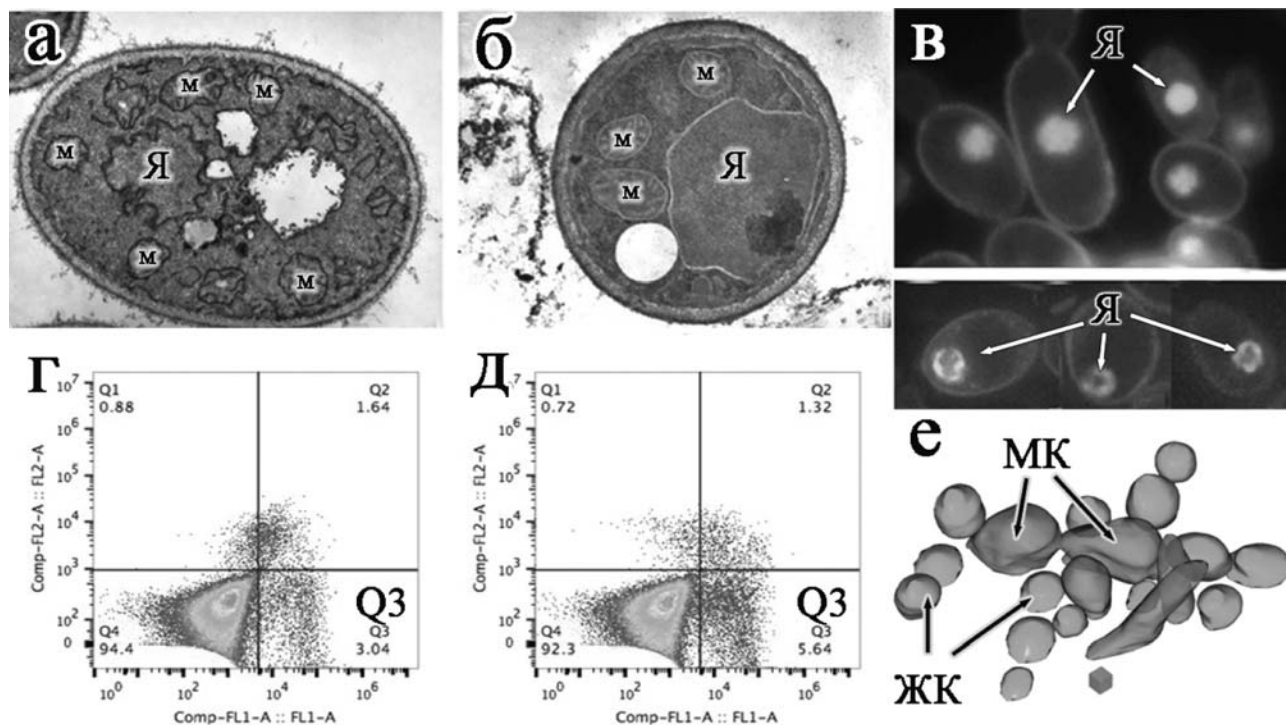


Рис. 1. Сравнительный цитологический анализ клеток *Candida maltosa* в условиях углеродного голодания: а – ультратонкий срез, выявляющий целостность мембран ядра и митохондрий; б – ультратонкий срез начала конденсации хроматина в ядре; в – флуоресцентная микроскопия конденсации хроматина, DAPI; г – проточная цитофлуориметрия контрольных клеток; д – проточная цитофлуориметрия голодающей популяции, (Q3 – окрашены Annexin-FITC). Исследование проводилось на цитофлуориметре BD Accuri C6 (BD Biosciences, USA); е – Трехмерная реконструкция голодающей популяции. Я – ядро, М – митохондрии, МК – мертвые клетки, ЖК – живые клетки

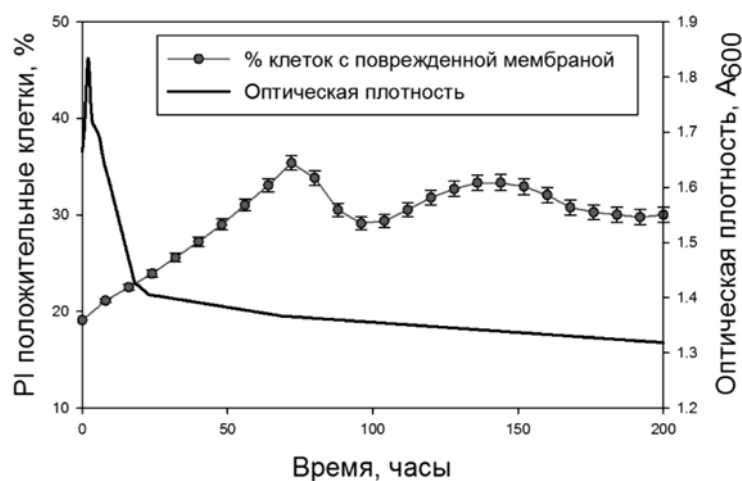


Рис. 2. Динамика гибели клеток при голодании в популяции

у голодающей культуры, а также изменением уровня основных полисахаридных компонентов клеточной стенки и активизации гидролаз (Dmitriev, 2016), что говорит об участии этих структур в происходящих процессах в начале голодания.

Литература

1. Dmitriev V.V., Crowley D.E., Zvonarev A.N. et al. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. *Yeast* 2016;33:55–62. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1002/yea.3140.

Азотный статус *Pseudomonas putida* BS3701 и дифференциальная экспрессия некоторых консервативных межгенных участков

Иванова Е.В.^{1,2}, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹ Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушино,
ivanova05evgenia99@yandex.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38327

Активность генов катаболизма нафталина *P. putida* BS3701 снижается при снижении концентрации ионов аммония в среде культивирования. В литературе описаны 2 регулятора псевдомонад, связанных с состоянием недостатка азота: активатор транскрипции белок NtrC и активатор трансляции нкРНК NrsZ. Информация о регуляторах, способных выступать в качестве репрессора экспрессии генов, в литературе отсутствует.

Мы подобрали условия культивирования штамма *P. putida* BS3701, при которых значительно изменяется активность глутаминсинтетазы (у *E. coli* ее активность зависит от активатора NtrC и σ^{54} -зависимого промотора). При снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ количество мРНК *glnA* увеличивалось в 54 раза.

Был произведен поиск малых некодирующих РНК в геноме *P. putida* BS3701, экспрессия которых могла бы быть зависима от активатора NtrC и σ^{54} -зависимого промотора. Сайты связывания белка NtrC предсказывали с помощью программы SigoID, наличие σ^{54} -зависимого промотора предсказывали с помощью программы iPro54-PseKNC.

Всего в геноме *P. putida* BS3701 было обнаружено 646 нкРНК, из которых и NtrC-, и σ^{54} -зависимых – 22. 9 нкРНК располагались в консервативных для разных видов *Pseudomonas* локусах, 5 из них дифференциально экспрессировались при снижении концентрации хлорида аммония.

NrsZ – предсказана программой Prokka по гомологии с ранее описанными в литературе. Имеет размер 179 нуклеотидов и располагается между генами, которые кодируют регулятор транскрипции NtrC и гипотетический белок. Количество РНК при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в 2,4 раза. В условиях дефицита азота NrsZ выполняет роль трансляционного активатора, связываясь с *rhlA*, который отвечает за синтез рамнолипидов у *Pseudomonas aeruginosa*.

RsmZ – предсказана программой Prokka по гомологии с ранее описанными в литературе. Имеет размер 134 нуклеотида и располагается между генами, которые кодируют сигма-фактор RpoS и белок ферредоксин FdxA. Количество РНК при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в 5,4 раза. В литературе описано, что эта нкРНК связывается с белком-репрессором трансляции RsmA и блокирует его. Но об участии в метаболизме азота информация отсутствует.

NarK-motif был предсказан в 2017 году Weinberg с соавторами как консервативный паттерн для бета- и гаммапротеобактерий. Протяженность мотива 76 нуклеотидов, располагается между генами, которые кодируют предполагаемый регулятор транскрипции PdtA и нитрат транспортер NasA. Количество РНК при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в 42 раза. С мотивом NarK перекрывается предсказанная программой presRAT некодирующая РНК ncRNA57. Она имеет размер 73 нуклеотида. Количество РНК при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в 64 раза.

ncRNA219 предсказана программой presRAT. Размер 186 нуклеотидов, располагается между генами, которые кодируют гипотетический белок и белок GspE системы секреции АТФазы 2 типа. Количество РНК при снижении концентрации хлорида аммония с 20 до 0,25 мМ увеличивалось в 12,7 раза.

На следующем этапе мы планируем поставить эксперименты по определению 5' и 3' концов РНК, чтобы понять действительно ли эти участки являются генами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01138, <https://rscf.ru/project/22-24-01138/>.

Применение методов диагностики растительных экстрактов зернобобовых культур на наличие возбудителя бактериального ожога гороха

Игнатъева И.М.¹, Кононова Е.П.¹, Доморацкая Д.А.^{1,2}

¹Всероссийский центр карантина растений ФГБУ «ВНИИКР», Московская обл.,
babiraigirmi@ya.ru

²ФГБОУ ВО «РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38328

В рамках научного обследования посевных площадей зернобобовых культур в июле 2022 г. на территории Ставропольского края осуществлен отбор растительного материала растений-хозяев возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (далее *P. syringae* pv. *pisi*). Всего было отобрано 22 образца вегетативных частей растений. Целью исследования послужило применение методов диагностики фитопатогена для дальнейшего пополнения коллекции бактериальных культур.

Для совместного выявления возбудителей болезней зернобобовых и возбудителя бактериального ожога гороха из растительных экстрактов провели изоляцию на универсальных питательных средах King B и YPGA [1]. Учитывая разнообразие морфотипов колоний, изолировали 65 бактериальных колоний. ДНК бактериальных культур использовали для ПЦР-тестирования с праймерами 8UA/519B, задачей которого являлось получение ампликонов для секвенирования по Сэнгеру [2]. Наличие ампликонов и их качество определяли с помощью геледокументирующей системы (BioRad, США) после электрофореза продуктов реакции в 1,5%-м агарозном геле. Ампликоны длиной 500 н.п. секвенировали. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программы BioEdit. Расшифрованные нуклеотидные последовательности сравнивали с помощью сервиса BLAST с последовательностями, размещенными в GenBank. После идентификации последовательностей, определили происхождение 12 изолятов, принадлежащих роду *Pseudomonas*. Их тестировали специфичными для *P. syringae* pv. *pisi* праймерами AN 7F/7R, Qing et al., 2016 [3, 4], в результате чего был получен положительный сигнал для одного бактериального штамма, выделенного из подсолнечника. Изоляту присвоили коллекционный номер в бактериологической коллекции (0628) и провели дополнительные исследования с целью идентификации штамма. В качестве дополнительных диагностических тестов использовали биохимический и культурально-морфологический методы.

Для определения биохимических свойств штаммов целевого организма (0484) и исследуемого штамма (0628) использовали набор API-20E. Установлено, что для штамма 0628 прослеживаются положительные реакции на L-аргинин, натрия цитрат трехзамещенный, L-триптофан, бактериальная суспензия приводит к сбраживанию D-глюкозы и D-мелибиозы, в то время как для целевого организма характерна положительная реакция только на L-триптофан.

Для определения культурально-морфологических признаков целевого организма (0484) и исследуемого штамма (0628) использовали питательные среды King B и SNAC [1]. После 4 дней инкубации на среде King B колонии целевого организма (0484) бледные, полупрозрачные, выделяют флуоресцирующий пигмент, а колонии исследуемого штамма (0628) – желтые, матовые, не выделяют флуоресцирующий пигмент (рис. 1).

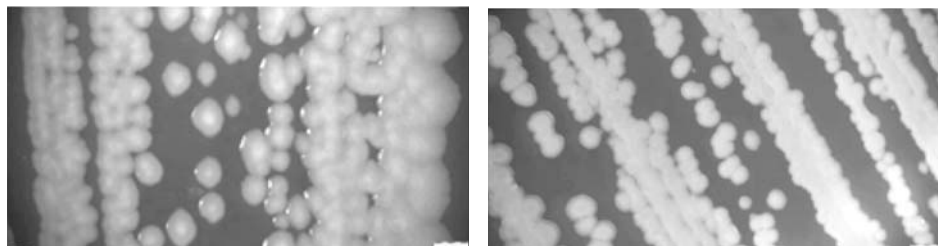
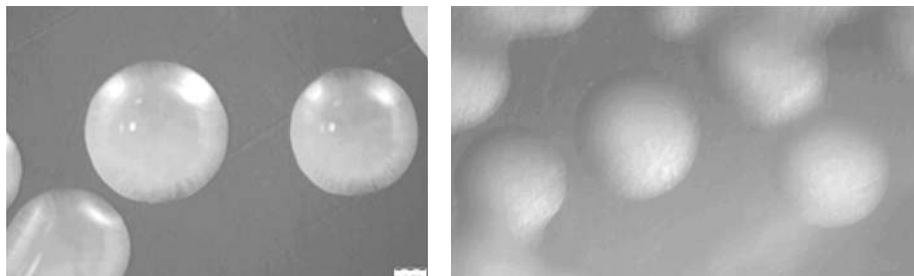


Рис. 1. Типичные колонии штамма 0484 (слева) и 0628 (справа) после 4 суток инкубации на среде Кинга Б (фото сделано на микроскопе OLYMPUS)

Рис. 2. Типичные колонии штамма 0484 (слева) и 0628 (справа) после 4 суток инкубации на среде SNAC (фото сделано на микроскопе OLYMPUS)



После 4 дней инкубации на среде SNAC колонии целевого организма (0484) округлые, белые до прозрачных, куполообразные (леван-положительные), а колонии исследуемого штамма (0628) – неровной формы, бледные, матовые, плоские (рис. 2).

Результаты проведенных дополнительных методов идентификации выделенного штамма 0628 указывают на различия его биохимических свойств и культурально-морфологических признаков с целевым организмом, что может указывать на принадлежность изолята к другой генетической группе патовара возбудителя бактериального ожога гороха.

Литература

1. Grimault V. International Rules for Seed Testing. 7-029: Detection of *Pseudomonas syringae* on *Pisum sativum*. Annex to Chapter 7: Validated Seed Health Methods. Effective from 1 January 2018. Host: *Pisum sativum* L. s.l. (pea). Pathogen: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (bacterial blight) / V. Grimault, R. Germain, A. Politikou.
2. Белкин Д.Л. Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов / Д.Л. Белкин, Г.Н. Бондаренко, А.Б. Яремко, Д.А. Уварова // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. – Т. 2(28). – С. 31–34.
3. Qing Ch. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds / Ch. Qing, Q. Jun-ting, L. Zhen-ji, F. Zhi-peng, L. Fu-rong, C. Hong-yun, Y. Jian-ping // Acta Phytopathologica Sinica. – 2016. – Vol. 46, Is. 2. – P. 169–175.
4. Игнатьева И.М., Словарева О.Ю. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в семенном и растительном материале зернобобовых культур // Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур». – 2021. – С. 182–186.

Молекулярно-генетическая организация IncP-7 плазмиды pD4A-46, контролирующей устойчивость к тетрациклину

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

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
tatiz@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38329

Плазмида pD4A-46 была обнаружена в мультирезистентном штамме *Pseudomonas fluorescens*, изолированном с песчанно-грунтового покрытия детской площадки г. Пушкино, и отнесена к группе несовместимости P-7 на основании ПЦР-тестирования со специфичными праймерами к *rep*-области. Конъюгационный перенос pD4A-46 в бесплазмидный реципиентный штамм *P. putida* KT2442 показал, что данная плазмида несёт в своём составе детерминанты устойчивости к тетрациклину. Трансконъю-

ганты KT2442 (pD4A-46) приобретали способность к стабильному росту при концентрации тетрациклина в среде 30 мкг/мл. Антибиотикорезистентные плазмиды группы несовместимости P-7 достаточно редки, а IncP-7 плазида устойчивости к тетрациклину описана нами впервые.

Секвенирование плазмидной ДНК проводили на платформе MiSeq (Illumina). Библиотеки ДНК для секвенирования готовили с использованием набора реагентов TruSeqLT (Illumina, США). Парноконцевое секвенирование полученных библиотек проводили с использованием набора реагентов MiSeq® ReagentKitv3, 600 циклов. Анализ качества полученных прочтений проводили с помощью ПО FastQC версии 0.11.3. Парноконцевые чтения при помощи ассемблера Unicycler были преобразованы в полную последовательность плазмиды. Циркуляризация pD4A-46 была подтверждена при помощи BLAST. Первичная аннотация плазмидной нуклеотидной последовательности проведена программой Prokka. Размер полученной последовательности pD4A-46 составил 150028 п.н. В составе плазмиды выявлено 192 открытые рамки считывания. Репликон pD4A-46 относится к pCAR-типу: нуклеотидная последовательность репликативной области *repA-oriV* pD4A-46 на 94,36% идентична *repA-oriV* плазмиды биодеградации карбазола/диоксида рСАР1(AB088420), принадлежащей к группе несовместимости P-7, кластер активной сегрегации *parWABC* – на 96,42%. Тра-область pD4A-46, составляющая треть от общей последовательности плазмиды, также наиболее гомологична соответствующему региону рСАР1. Проведён анализ генов-кандидатов, предположительно ответственных за резистентность штамма – хозяина pD4A-46 к тетрациклину.

Разработка молекулярно-биологического подхода к восстановлению зубной эмали

Калинина А.Е.¹, Савельева П.Д.¹, Кошель Е.И.¹, Нургалиев И.М.²

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург,
kalininaanastasia71@gmail.com

² ООО «ЛабПэк»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38330

Кариес на сегодняшний день является ведущей проблемой в мировой стоматологии (рис. 1), одна из тенденций в способах предотвращения его развития является профилактика здоровых интактных зубов [1]. Устранять причины развития повреждённой зубной эмали эффективнее и выгоднее в долгосрочной перспективе, нежели устранять последствия.

В этой связи, актуальным является разработка биотехнологических средств (зубных имплантатов, инвазивных гелей, капов, микрокапсул) снижающих вероятность возникновения нового кариеса на здоровых молочных и постоянных зубах путем циклического использования: эмаль становится крепче путём точечного применения препаратов (за счет нового слоя эмали), соответственно, менее восприимчивой к кислотам бактерий – новые очаги кариеса не возникают.

Многие белки эукариотов могут применяться для ускорения регенерации тканей полости рта после травм, вызванных заболеваниями, такими как кариес зубов. Например, амелогенин человека (АМГ) – внеклеточный белок эмали, секретируемый узкоспециализированными клетками эмали – амелобластами [2].

В связи с этим, целью данного исследования стало создание генно-инженерных конструкций для производства рекомбинантного амелогенина человека, применяемого для поверхностной реконструкции зубной эмали (рис. 2).

Согласно Nakki и Deutsch обработка различными концентрациями рекомбинантного AMELIX (продуцированного в *E. coli* BL21 и A5039) иммортализованных цементобластов мышей продемонстрировала стимуляцию пролиферации и минерализации клеточных линий [2, 4], поэтому для данного эксперимента планируется синтез гена AMELIX (X связанного амелогенина) с подобранными в процессе

дизайна сборки последовательности сайтами рестрикции для последующего клонирования гена в вектор «по липким концам» и трансформацией или трансфекцией в оптимальный организм экспрессии (прокариотический – *E. coli*, эукариотический – дрожжи, НЕК клеточная линия [3]). Синтез гена будет осуществляться ПЦР-сборкой по различным схемам:

- 1) одно-/двухэтапный синтез длинных фрагментов ДНК (PIDS) с использованием коротких олигонуклотидных последовательностей, с перекрытием в ~20 нуклеотидов, собранных последовательно;
- 2) одно-/двухэтапный синтез ДНК (PIDS) с использованием длинных олигонуклотидных последовательностей (до 120 нуклеотидов), собранных последовательно (рис. 2);

Микробиом полости рта

Components of the oral microbiome:

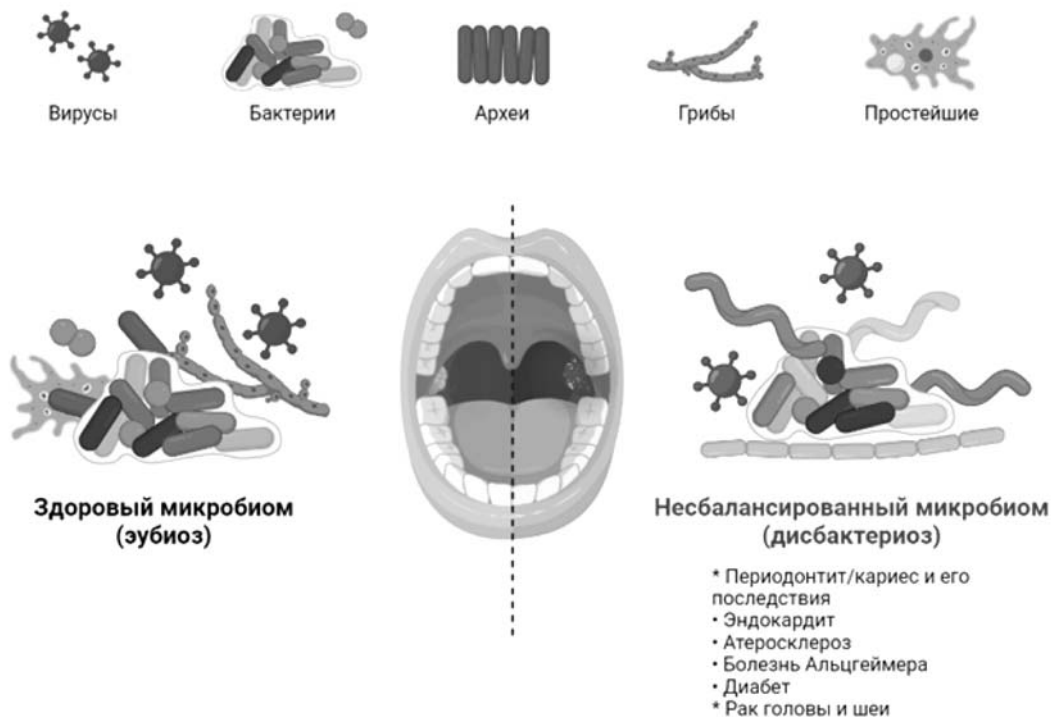


Рис. 1. Микробиом полости рта. Причины возникновения кариеса

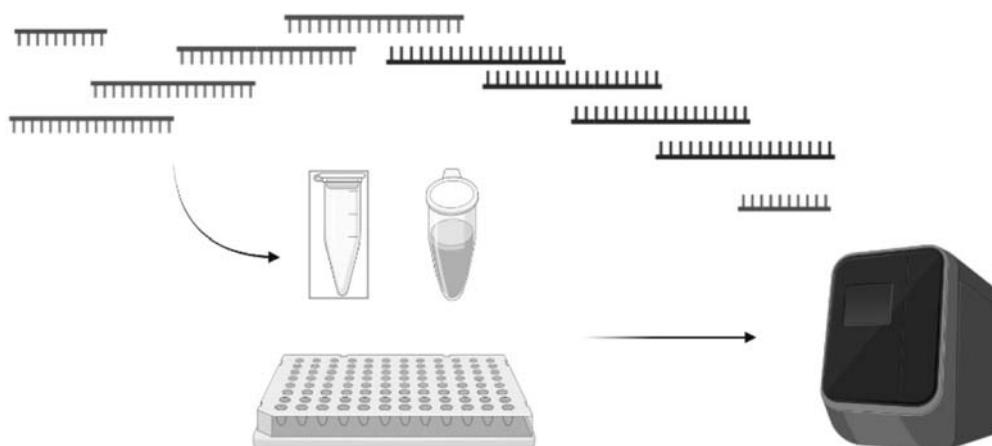


Рис. 2. Последовательная сборка гена методом ПЦР

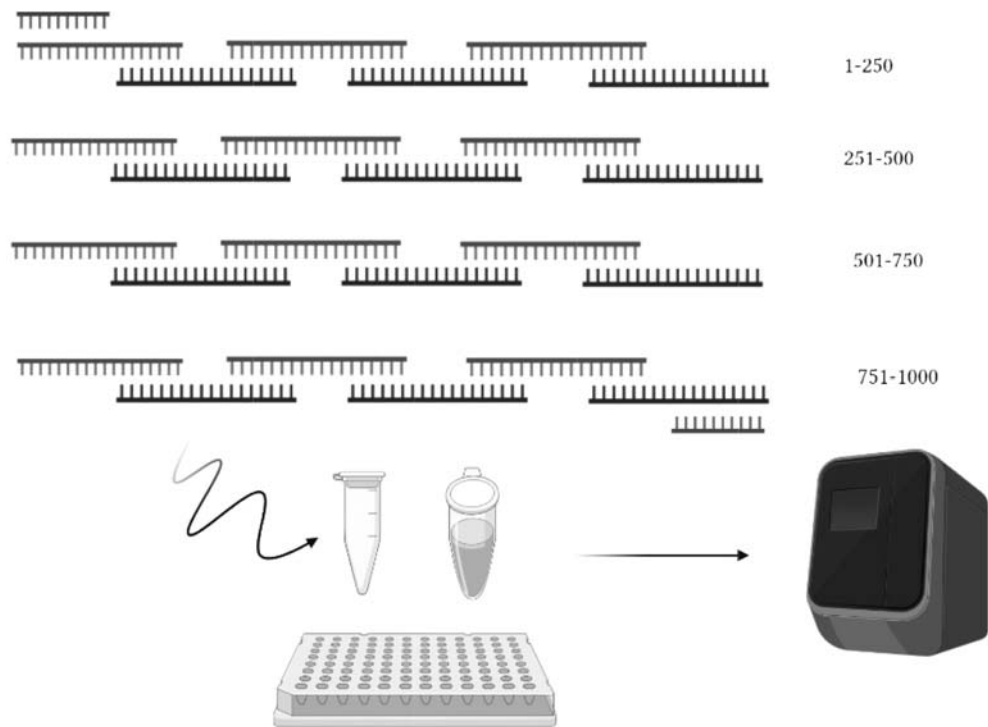


Рис. 3. ПЦР-сборка последовательности ДНК с перекрытием расширения

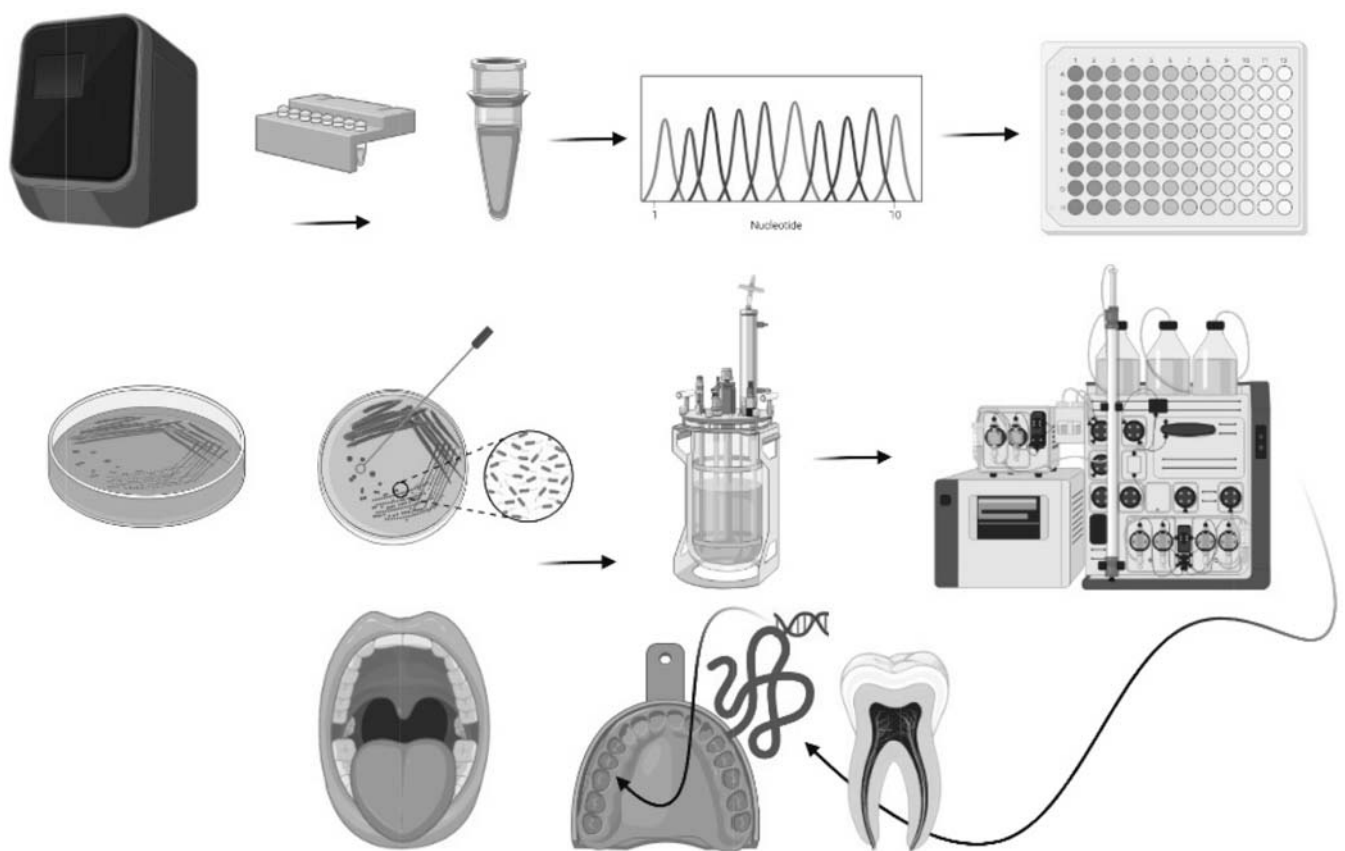


Рис. 4. Создание генно-инженерной конструкции для восстановления зубной эмали

3) одно-/двухэтапный синтез фрагментов ДНК (PIDS) с использованием коротких олигонуклеотидных последовательностей, с перекрытием в ~20 нуклеотидов, собранных с расширением перекрытия;

4) одно-/двухэтапный PIDS метод с использованием длинных олигонуклеотидов, собранных с расширением перекрытия (рис. 3).

В задачах эксперимента также стоит подбор оптимальной схемы в разнице концентраций внутренних и фланкирующих праймеров в каждой из методик, подбор программы для ПЦР, с целью получения концентрированного и чистого специфического участка, с минимальным количеством мутаций в интересующей последовательности. Проверка мутаций будет осуществляться секвенированием по методу Сэнгера.

Варианты сборки без мутаций будут отобраны для оптимизации экспрессии гена (проверка уровня экспрессии планируется осуществляться с помощью SDS-PAGE, а активность белка вестерн-блоттингом и ИФА). Очистка белка будет осуществляться хроматографическими методами: металл-хелатной аффинной хроматографией (ИМАС) и гель-фильтрацией (обессоливание и разделение по размеру).

В продолжение эксперимента стоит задача выбора способа «упаковки» полученной конструкции с экспрессией белка амелогенина для точечной доставки в полость рта человека (рис. 4).

Амелогенин – ключевой игрок в процессе амелогенеза (создания каркаса зубов), он является транзитным белком (секретируется, созревает и разрушается по выполнению своей роли протеазами), хотя сборка эмали происходит моментально при контакте амелогенина с минералами, поэтому цель данного исследования является столь актуальной.

Литература

1. Бутаева З.Р. Современные подходы к профилактике кариеса зубов / З.Р. Бутаева, Ю.В. Фазылова. – Текст: непосредственный // Молодой ученый. – 2020. – № 18(308). – С. 193–195. – URL: <https://moluch.ru/archive/308/69421/> (дата обращения: 29.10.2022).
2. Hakki S.S., Bozkurt S.B., Türkay E., Dard M., Purali N., Götz W. Recombinant amelogenin regulates the bioactivity of mouse cementoblasts in vitro // International Journal of Oral Science. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 15.
3. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учебно-справочное пособие. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2008. – 514 с.
4. Deutsch D., Chityat E., Hekmati M., Palmon A., Farkash Y., Dafni L. High Expression of Human Amelogenin in E. Coli // Advances in Dental Research. – 1996. – Vol. 10. – № 2. – P. 187–194.

Клеточные модели *N. gonorrhoeae* с β-лактамазой расширенного спектра действия

Кандинов И.Д., Винокурова А.С., Антонова О. В., Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А.

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38331

Актуальность

Развитие множественной лекарственной устойчивости у патогенного микроорганизма *N. gonorrhoeae* представляет серьёзную проблему во всём мире. В настоящее время в качестве препарата выбора для терапии гонококковой инфекции используются цефалоспорины III поколения – цефтриаксон, цефотаксим и цефиксим, применяемые в формате монотерапии или в комбинации с макролидным антибиотиком азитромицином.

Особое значение для приобретения резистентности имеет фермент β -лактамаза, кодируемая геном *bla*. В последнее время вариант гена *bla*_{TEM-135} всё чаще встречается в мировой популяции *N. gonorrhoeae*. Всего одна нуклеотидная замена GGT→AGT в гене *bla*_{TEM-135}, позволит гонококку экспрессировать β -лактамазу расширенного спектра действия типа TEM-20, способную гидролизовать цефалоспорины, с без утраты способности к разрушению пенициллинов. Таким образом, существует риск появления у гонококков β -лактамаз расширенного спектра действия, что может угрожать применению цефалоспоринов III поколения.

Цель работы

Целью данной работы было изучение свойств штаммов *N. gonorrhoeae*, трансформированных плазмидами *pbla*_{TEM}, содержащих различные варианты гена *bla*. Особое внимание было уделено изучению свойств штамма *N. gonorrhoeae*, несущего плазмиду *pbla*_{TEM-20}.

Результаты

Исследована чувствительность полученных штаммов, содержащих различные плазмиды *pbla*_{TEM}, к нескольким группам β -лактамных антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы (табл. 1), а также жизнеспособность данных штаммов.

Проведено математическое моделирование кривых роста и гибели клеток с помощью уравнения Ферхюльста и Чика-Ватсона.

Оказалось, что штамм *N. gonorrhoeae*, содержащий плазмиду *pbla*_{TEM-20}, обладает сниженной жизнеспособностью: наблюдался выход кривой роста клеток на плато через 6 часов культивирования, как в отсутствие, так и в присутствии антибиотика. Сниженная жизнеспособность клеток, несущих плазмиду *pbla*_{TEM-20}, не была связана с утратой плазмиды в процессе культивирования.

Таблица 1

Устойчивость *N. gonorrhoeae*, содержащих плазмиды *pbla*_{TEM}, к β -лактамным антибиотикам: величины МПК, измеренные методом серийных разведений

Антибиотик	Критерии EUCAST	МПК, мг/л			
		WT*	<i>pbla</i> _{TEM-1}	<i>pbla</i> _{TEM-135}	<i>pbla</i> _{TEM-20}
Бензилпенициллин (PEN)	S: MIC _{pen} ≤ 0.06 R: MIC _{pen} > 1	0.25	16 (R)	32 (R)	16 (R)
Ампициллин (AMP)	–	0.125	8	8	16
Цефуроксим (СХМ)	–	0.008	0.004	0.004	2
Цефтриаксон (CRO)	S: MIC _{cro} ≤ 0.125 R: MIC _{cro} > 0.125	0.03 (S)	0.015 (S)	0.03 (S)	4 (R)
Цефиксим (CFM)	S: MIC _{cfm} ≤ 0.125 R: MIC _{cfm} > 0.125	0.015 (S)	0.015 (S)	0.015 (S)	16 (R)
Цефотаксим (CTX)	S: MIC _{ctx} ≤ 0.125 R: MIC _{ctx} > 0.125	0.015 (S)	0.008 (S)	0.015 (S)	8 (R)
Цефепим (FEP)	–	0.03	0.015	0.015	16
Меропенем (MEM)	–	0.002	0.002	0.002	0.004
Имипенем (IPM)	–	0.004	0.008	0.004	0.008
Дорипенем (DOR)	–	0.002	0.002	0.002	0.002

* WT – wild-type, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, не содержит плазмиду *pbla*_{TEM}. S – чувствительные, R – устойчивые, согласно критерию EUCAST (<http://www.eucast.org>).

Выводы

Математическое моделирование кривых роста показало, что штаммы, несущие плазмиды, обладают сниженной жизнеспособностью по сравнению с *N. gonorrhoeae* дикого типа. Сниженную жизнеспособность можно объяснить двумя причинами: а) наличием самой плазмиды, что требует от клеток дополнительных затрат энергии; б) ингибированием роста клеток из-за экспрессии β -лактамазы расширенного спектра действия. Возможно, это объясняет более низкую частоту встречаемости таких штаммов в популяции.

Модификация питательных сред для культивирования пропионовокислых бактерий экстрактом *Trigonella foenum-graecum* L.

Карапетян М.Г.

Базовая кафедра микробиологии медико-биологического факультета
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38332

Пропионовокислые бактерии – неподвижные грамположительные факультативные анаэробы, палочковидной формы, размером от 0,5 до 1,5 мкм. Можно наблюдать полиморфизм формы микроорганизма, с учетом возраста культуры, в молодых культурах наблюдается искривленные, слегка ветвящиеся палочки, а в более старых микроорганизмах кокковидную форму. Пропионовокислые бактерии, являются родственными молочнокислым бактериям по ряду гетероферментативных свойств. Подобно молочнокислым бактериям, они не встречаются в водоемах и почве. В большинстве случаев пропионовокислые бактерии обитают в рубце и кишечнике жвачных животных, а также в молочных продуктах, но не в самом молоке. Бактерии данного рода являются возбудителями пропионовокислого брожения, они способны к сбраживанию лактозы, глюкозы, некоторых других углеводов, а также некоторых спиртов с образованием уксусной и пропионовой кислот и CO_2 [1–3].

Пропионовокислые бактерии обширно используются в медицине, в качестве пробиотиков. *Propionibacterium* spp. хорошо приживаются в кишечнике и снижают генотоксическое действие различных химических соединений, а также ультрафиолетовых лучей, что в значительной степени препятствует появлению и разрастанию опухолевых заболеваний [3]. Следует отметить, что пропионовокислые бактерии обширно используются и в пищевой промышленности. Инновационные технологии применения пропионовокислых бактерий затронули кисломолочную, мясную и хлебопечение продукции [1–3].

Культивирование пропионовокислых бактерий происходит в специальной питательной среде, которые в свою очередь отличаются сложностью приготовления и очень высокой стоимостью. Следовательно, актуальность поиска нового сырья для приготовления питательной среды, позволяющий массово культивировать пропионовокислых бактерий, необходимо. Такое сырье Пажитник сенной (*Trigonella foenum-graecum* L.). Данное растение (*Trigonella foenum-graecum* L.) является лекарственным и включена в ряд европейских фармакопей [4].

Таким образом цель исследования разработка новой питательной среды модифицированный *Trigonella foenum-graecum* L. Эксперимент проводился в микробиологической лаборатории базовой кафедры медико-биологического факультета Северо-Кавказского федерального университета.

В результате проведенного эксперимента было выявлено, что на модифицированной питательной среде, содержащей 20% экстракта *Trigonella foenum-graecum* L., количество колоний пропионовокислых бактерий на 3 сутки культивирования составляло 67,34 ед., что в 3 раза превышает количество, чем в контроле. Через 5 культивирования количество колоний 98,13 ед., что 2,6 раз больше контроля. Через 7 суток от начала эксперимента количество колоний составило 103,45 ед., и вновь больше контроля в 2,6 раз.

Микроорганизмы, выделенные из колоний, выросших на модифицированной питательной среде, микроскопировали, окрасив мазки по Грамму и отмечая морфологию, характерную пропионовокислым бактериям.

Таким образом, питательная среда, модифицированной водным экстрактом *Trigonella foenum-graecum* L. в концентрации 20%, является пригодной для культивирования пропионовокислых бактерий и ее ростовые качества достоверно выше, чем у классической питательной среды. С учетом низкой себестоимости, модифицированной питательной среды, есть перспективы ее промышленного использования.

Литература

1. Дзюва Р.В. Пропионовокислые бактерии при производстве твердых сыров / Р.В. Дзюва // Студенческая наука – агропромышленному комплексу: Научные труды студентов Горского Государственного аграрного университета. – Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2017. – С. 327–328.
2. Нанинец П.Д. Микрофлора молочнокислых продуктов / П.Д. Нанинец, Ю.В. Королева, Е.А. Петухова // Молодежь и наука на Севере: Материалы докладов III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции (с элементами научной школы). В 2-х томах, Сыктывкар, 12–16 марта 2018 года. – Сыктывкар: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», 2018. – С. 147–148.
3. Рыжкова Е.П. Классические пропионовокислые бактерии как пробиотики / Учебное пособие – М.: изд. Биологический факультет МГУ, 2018 – 44 с.
4. Srinivasan K. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effect// Food reviews international. – 2006. – Vol. 22, № 2. – P. 203–224.

Индукция структурных мутаций под действием γ-квантов и тяжелых ионов в гаплоидных эукариотических клетках

Кокорева А.Н.^{1,2}, Жучкина Н.И.¹, Колтовая Н.А.¹

¹Объединенный институт ядерных исследований

² Государственный университет «Дубна»,
kan@jinr.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38333

Облучение ионизирующим излучением приводит к различным повреждениям, мутациям и гибели клеток. Наиболее опасными повреждениями ДНК являются двунитевые разрывы ДНК, которые служат мишенями нескольких систем репарации [1, 2]. Функционирование этих систем приводит к устранению подавляющей части повреждений или к появлению различных видов мутаций и структурных перестроек. Репарация путем гомологичной рекомбинации может сопровождаться конверсией и кроссинговером, репарация путем воссоединения негомологичных концов, может приводить к возникновению делеций. Консервативность основных клеточных молекулярных процессов (в том числе и репарационных) позволяет использовать в качестве модельной системы эукариотические одноклеточные дрожжи. Для анализа закономерностей возникновения структурных перестроек в данной работе использовали гаплоидные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Межхромосомные рекомбинационные события определяли с помощью инвертированных повторов гена *lys2*, локализованных во II и III хромосомах и обеспечивающих потенциальную возможность осуществления гомологичной рекомбинации [3]. Для изучения внутривхромосомных рекомбинационных событий использовали штаммы с теми же последовательностями гена *lys2*, однако в этом случае обе последовательности находились во II хромосоме и были разделены геном *LEU2*. Восстановление син-

теза лизина происходит в результате конверсии без кроссинговера, либо с кроссинговером. В последнем случае мы можем детектировать делеции по отсутствию гена *LEU2*. Для анализа закономерностей возникновения делеционных мутантов использовали также центромеросодержащую плазмиду YCpL2 (13.8 тпн, маркеры *URA3*, *TRP1*, *LEU2*, *CAN1*, *CYH2*), позволяющую проводить прямую селекцию утраты участка *CAN1-CYH2* [4]. В качестве селективного маркера наличия плазмиды использовали *URA3*. Размер и локализацию возникшей делеции определяли с помощью генетического, электрофоретического и рестрикционного анализа. Облучение γ -квантами проводили на терапевтическом аппарате «Рокус», источник ^{60}Co (мощность дозы 0,7 Гр/мин). Облучение ускоренными тяжелыми ионами с энергией 30–52 МэВ/нукл и ЛПЭ 17–124 кэВ/мкм проводили на Циклотроне У-400М.

Выживаемость клеток для всех гаплоидных штаммов описывалась экспоненциальной функцией. Зависимость частоты рекомбинационных перестроек, в том числе сопровождающихся делециями, от дозы описывалась линейной и линейно-степенной функцией в случае облучения γ -излучением и тяжелыми ионами соответственно, и была порядка $\sim 10^{-3}$ при дозе облучения 80 Гр (рис. 1а). Зависимость частоты делеций на плазмиде от дозы описывалась линейной функцией в обоих случаях (рис. 1б). Отметим, что частота хромосомных делеций в результате рекомбинации индуцируется на два порядка эффективнее плазмидных делеций, 10^{-3} и 10^{-5} соответственно.

Плазмидная система позволяет отбирать протяженные делеции размером от 400 пн до 6 тпн, захватывающие от двух до четырех генов. Генетический анализ отобранных мутантов показал, что в необлу-

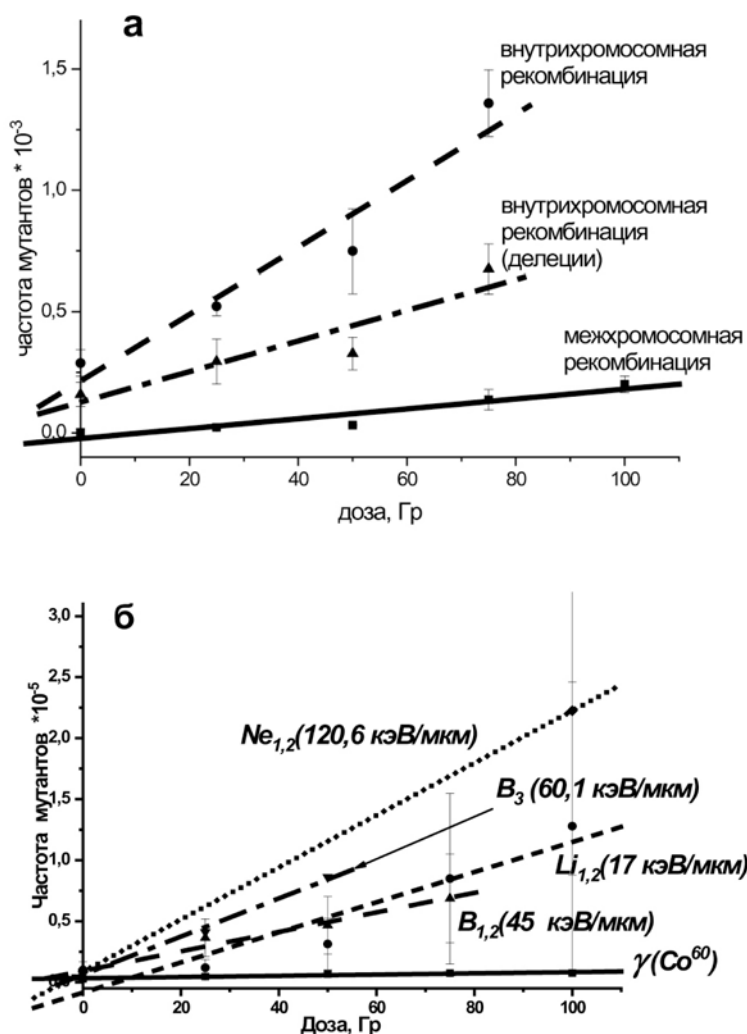


Рис. 1. Зависимость частоты рекомбинационных перестроек и делеций от дозы γ -облучения (а) и частоты плазмидных делеций от дозы облучения γ квантами и тяжелыми ионами (б)

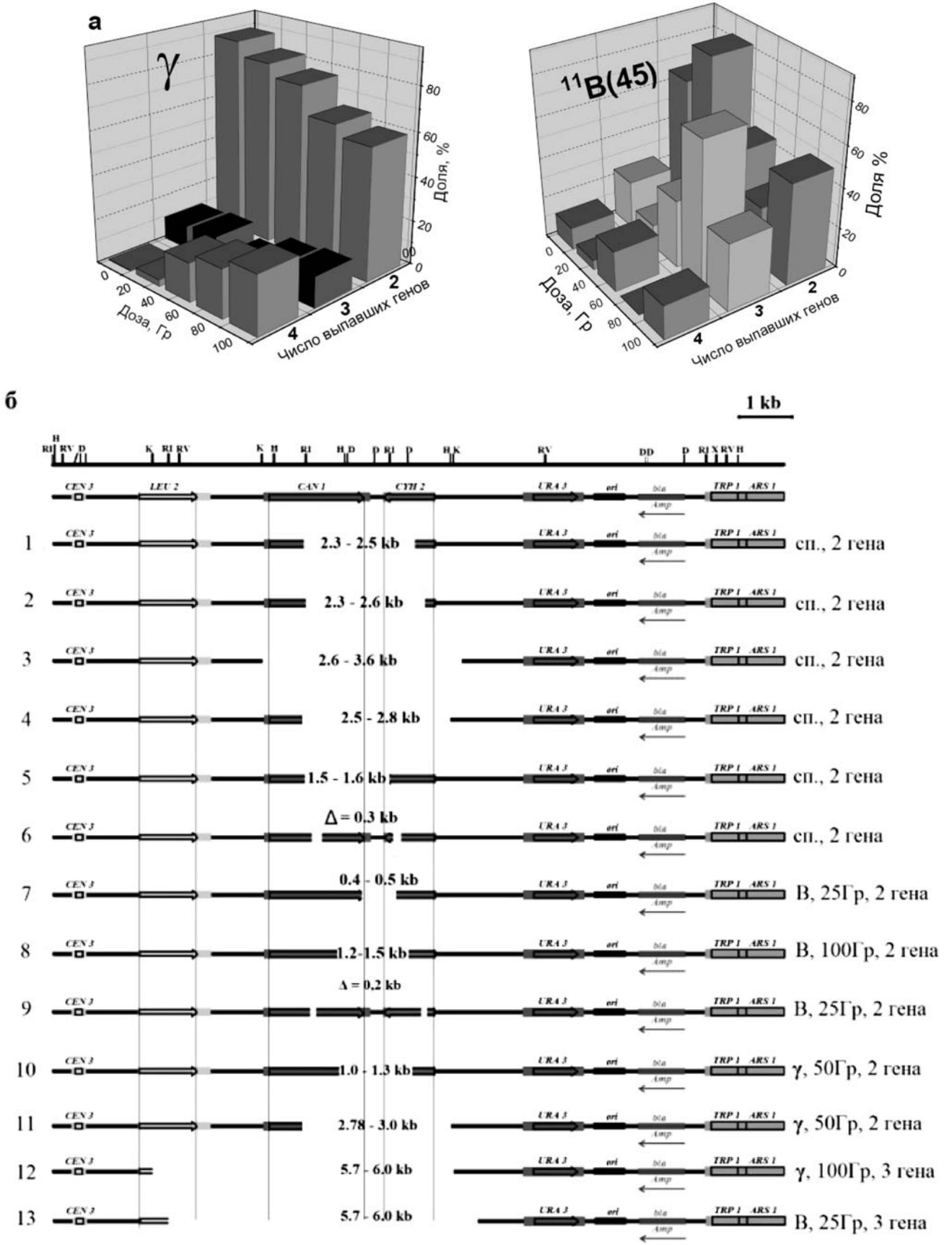


Рис. 2. Генетический (а) и рестрикционный (б) анализ делеционных мутантов. Вверху приведена рестрикционная карта плазмиды YCrL2 и локализация генов (б)

ченых клетках большую часть (70–90%) составляют делеции, захватывающие 2 маркера *CAN1-CYH2*, доля мутантов с делециями, захватывающими 4 маркера (*TRP1, LEU2, CAN1, CYH2*), составляла не более 1.0%. При γ -облучении с увеличением дозы доля мутаций с более протяженными делециями возрастала до 30%, а доля с делециями, захватывающими два гена соответственно уменьшалась. При облучении тяжелыми ионами индукция делеций была более эффективной. Закономерность спектра сохранилась, основную долю делеций, как и при γ -облучении составляли делеции захватывающие 2 гена, но доля делеций захватывающих 3 и 4 гена увеличилась.

Генетический анализ был дополнен электрофоретическим и рестрикционным анализом. На рис. 2б представлены результаты рестрикционного анализа делеций, захватывающих два или три гена и возникших спонтанно или индуцированных γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B . Размер делеций у проанализированных мутантов составлял от 0,4 до 6 тпн. У двух мутантов были обнаружены двойные делеции размер которых в сумме не превышал 200–300 пн. В дальнейшем для понимания механизмов возникновения делеционных событий планируется секвенировать делеционные концы и плазмидную ДНК мутантов, утративших четыре гена.

Литература

1. *Jinbao Li, Huize Sun, Xuefeng Chen, et al.*, 2019, *Acta Biochim Biophys Sin*, 51(9): 879–88.
2. *Mitch McVey and Sang Eun Lee*, 2008, *Trends Genet*, 24(11): 529–538.
3. *Jin Y.H., Obert R., Burgers P.M.J. et al.*, 2001. *PNAS* 98: 5122–5127.
4. *Tsukamoto Y., Kato J., Ikeda H.* 1996. *Genetics*. 142: 383–391.

Применение метода MAHDS для построения множественных выравниваний аминокислотных последовательностей

Костенко Д.О.^{1,2}, Коротков Е.В.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва,
kdo011@campus.mephi.ru

² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38334

Построение множественных выравниваний является важной задачей биоинформатики и позволяет находить эволюционные и функциональные взаимосвязи в цепочках нуклеиновых кислот и белков живых организмов. Однако данная задача является NP-полной. Это означает, что время, затрачиваемое на вычисление её детерминированного решения, экспоненциально зависит от размера входных данных (в частности количества последовательностей). По этой причине все используемые на практике методы построения множественных выравниваний применяют разнообразные эвристики, позволяющие решать данную задачу за приемлемое время, однако с потерей точности.

Ранее нами был разработан метод MAHDS, который позволяет строить множественные выравнивания за время, линейно зависящее от количества последовательностей и квадратично от их средней длины. Данный метод показал, что он способен строить статистически значимые выравнивания последовательностей ДНК даже с количеством замен на символ равным $x = 4.4$. В то же время для других сравниваемых с MAHDS методов (T-Coffee, Muscle, ClustalW, MAFFT, Kalign) этот показатель составил $x < 2.5$.

Мы адаптировали MAHDS для выравнивания аминокислотных последовательностей [1]. MAHDS сравнивался с методами построения множественных выравниваний, представленными на ресурсе EMBL-EBI, для которых доступно Web API. В их число входит T-Coffee, MUSCLE, PRANK, Clustal Omega, Kalign, MAFFT. Для сравнения MAHDS с другими методами построения выравниваний использова-

лись следующие тестовые данные: база эталонных выравниваний белковых семейств BAliBASE, искусственные последовательности с определёнными свойствами и реальные белковые семейства с низким процентом идентичности (<20%), взятые из баз данных Pfam и HOMSTRAD. Для оценивания качества выравниваний использовались критерии CS и Z. CS отражает меру сходства двух выравниваний (эталонного и оцениваемого), а Z – статистическую значимость выравнивания.

В ходе тестирования на BAliBASE считались средние значения CS и Z по выравниваниям всех белковых семейств, представленных в этой базе. Целью тестирования было не только сравнение MAHDS с другими методами, но выбор наиболее биологически адекватных параметров метода MAHDS (которые также влияют и на оценку Z). Для подбора параметров мы максимизировали CS, стараясь не допустить существенных падений Z. В дальнейшем для построения и оценивания выравниваний мы использовали набор параметров, зафиксированный на данном шаге. В рамках тестирования на BAliBASE в сравнении с другими методами MAHDS показал превосходство по Z, однако отставание по CS.

Перед проведением дальнейших тестов по правилу 3 сигма был определён порог статистической значимости, при котором выравнивание можно считать не случайным. Для этого оценивалось Z выравниваний множеств случайных последовательностей. Порог Z_i оказался равен 10.

Для тестирования на искусственных последовательностях из случайных предковых последовательностей генерировались множества потомков путём внесения случайных вставок, делеций и замен (в итоговое множество предковая последовательность не входила). Было сгенерировано 81 различное множество искусственных последовательностей. Длина родительской последовательности составляла 600 символов. Количество дочерних последовательностей – 100. Создавались множества со свойствами из следующего диапазона. Количество вставок (и столько же делеций): [2, 5, 10]. Длина вставок (и такая же у делеций): [1, 5, 20]. Количество замен на символ: [0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7], соответственно, расстояние x между дочерними последовательностями (в заменах на символ) в сгенерированных множествах последовательностей составляло [0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8, 5.4]. Было показано, что MAHDS при малом количестве и длине вставок и делеций способен строить статистически значимые выравнивания даже при расстоянии между выравниваемыми последовательностями $x = 4.8$ замен на символ. Из остальных протестированных методов, наилучшие результаты показал MUSCLE. В таких же условиях MUSCLE способен строить статистически значимые выравнивания при $x = 2.4$ замен на символ, что существенно хуже, чем показатель MAHDS.

При тестировании на реальных белковых последовательностях мы сравнивали MAHDS с методами T-Coffee и MUSCLE, так как именно эти 2 метода показали хорошие результаты в предыдущих тестах. Мы построили выравнивания тремя методами для 21 белкового семейства и оценили Z полученных выравниваний. Для 16 из 21 семейств MAHDS построил наиболее статистически значимые выравнивания (для других 5 семейств либо выравнивания всеми методами оказались значимыми, либо наоборот незначимыми также у всех методов). В то же время для 4 семейств (PF00915, PF10846, PF10895 и PF13944) только MAHDS оказался способен построить статистически значимое выравнивание.

Литература

1. *Kostenko D.O., Korotkov E.V.* Application of the MAHDS Method for Multiple Alignment of Highly Diverged Amino Acid Sequences. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3764 <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.3390/ijms23073764>.

Биосинтез фосфолипидов у базидиомицетов: вклад основного и альтернативного путей, включая реакции ремоделирования жирных кислот, в определение молекулярного разнообразия

Котлова Е.Р.¹, Сенник С.В.¹, Серебряков Е.Б.², Мишарев А.Д.², Манжиева Б.С.¹,
Пожванов Г.А.^{1,2,3}, Пузанский Р.К.¹, Псурцева Н.В.¹

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург,
kotlova@yandex.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38335

В состав липидного бислоя мембран базидиомицетов входят глицерофосфолипиды, сфинголипиды и стерины. Как правило, среди глицерофосфолипидов преобладают фосфатидилхолины (ФХ) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ). Минорные классы представлены фосфатидными кислотами (ФК), фосфатидилсеринами (ФС), фосфатидилинозитами (ФИ), фосфатидилглицеринами и кардиолипинами. В мембранах ФХ, ФЭ и ФК распределены относительно равномерно, ФИ и ФС – асимметрично.

До начала 2000-х гг. данные о составе индивидуальных классов липидов, ограничивались результатами, полученными с помощью TLC и HPLC, которые дополнялись GC или GC-MS анализом жирных кислот. В результате комбинации этих методов, можно было получить информацию о количестве индивидуальных классов липидов и их жирнокислотном составе. Данные о составе молекулярных видов липидов стали доступны благодаря развитию масс-спектрометрии, в частности, появлению тройных квадрупольных (QQQ) и квадруполь-времяпролетных (Q-TOF) масс-спектрометров. Сформировалось представление об особенностях молекулярного состава липидов у представителей различных систематических групп – от микроорганизмов до человека, однако липиды базидиальных грибов на уровне отдельных молекул до недавнего времени не были изучены.

Гетерогенность молекулярных видов фосфолипидов определяется комбинацией четырех элементов, среди которых полярная голова, состоящая из фосфата и спирта, две жирные кислоты, присоединенные к глицериновой основе в sn-1 и sn-2 положениях, а также тип связи sn-1 между радикалом и глицерином (Nagayama, Riezman, 2018). Было установлено, что разнообразие фосфолипидного профиля связано с путями биосинтеза отдельных молекулярных видов липидов и последующими реакциями ремоделирования (обмена) их жирных кислот. Так, основная часть ФХ синтезируется по пути Кеннеди, где на первой стадии поглощенный клеткой холин фосфорилируется до фосфохолина с помощью холин-киназы; на второй, с участием СТР:фосфохолинтрансферазы, фосфохолин превращается в CDP-холин; на третьей, при участии холинфосфотрансферазы, высвободившийся фосфохолин присоединяется к диацилглицерину и образуется ФХ. В отдельных организмах, органах, клетках действует другой путь биосинтеза – последовательное метилирование ФЭ до ФХ ФЭ-метилтрансферазами. Данный путь, в частности, активен в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (McMaster, 2018). У дрожжей по пути Кеннеди синтезируются преимущественно молекулярные виды, содержащие 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 в положении sn-1 и 16:1, 18:1, 18:2 в положении sn-2, а по пути метилирования диненасыщенные молекулярные виды, например, 18:1/18:2. У базидиомицетов подобная оценка ранее не проводилась. Полученные нашей научной группой данные свидетельствуют о том, что по разнообразию фосфолипидного профиля (наиболее подробно изучены ФХ) базидиальные грибы уступают многим организмам. Основным молекулярным видом ФХ у них, как правило, является 18:2/18:2 (50% и более от суммы молекулярных видов), реже 18:1/18:2. Основную часть профиля (более 80%) составляют различные комбинации жирных кислот C16 и C18 ряда (Kotlova et al., 2022). Каким образом синтезируются эти липиды оставалось неизвестным, хотя данные по экспрессии генов *CPT1* и *CHO2*, кодирующих холинфосфотрансферазу и ФЭ-метилтрансферазу у *Flammulina velutipes*, демонстрировали в 30 раз более активную экс-

прессию *CPT1*, что косвенно свидетельствует о преобладании молекулярных видов, синтезированных по пути Кеннеди (Senik et al., 2015).

В настоящее время разработаны подходы, позволяющие судить о путях биосинтеза липидов по данным масс-спектрометрии. Среди них эксперименты с дейтерированными производными полярных групп: D9-холином и D4-этаноламином. Включение меченых полярных групп в ФХ и ФЭ (регистрируется по увеличению значения m/z на 9 и 4) свидетельствуют об образовании молекулярного вида липида по тому или иному пути.

Сравнение фосфолипидных профилей культур, выращенных на средах, содержащих и не содержащих холин, дает возможность оценить активность реакций ремоделирования жирных кислот в молекулах фосфолипидов (Patton-Vogt, de Kroon, 2020). В отсутствие свободного холина происходит активная разборка ФХ в реакциях с участием фосфолипазы D, фосфолипаз A1 и A2 и последующий ресинтез ФХ, в том числе неканонического молекулярного состава. Последующий обмен полярными группами приводит к увеличению молекулярного разнообразия других фосфолипидов.

В настоящей работе использовано два модельных вида базидиомицетов: *Irpex lacteus* 4341, накапливающий в равном соотношении 36:4 (18:2/18:2) и 36:3 (18:1/18:2) ФХ и *Flammulina velutipes* 1483, аккумулирующая преимущественно 36:4 (18:2/18:2). Проведенное с использованием LCMS-9030 (Q-TOF) (Shimadzu) и оптимизированной нами для анализа липидома грибов методики SWATH-MS исследование показало, что у 3–7 сут культур основные молекулярные виды ФХ, в т.ч. 34:2, 36:4, 36:3, 36:2, составляющие основу мембран, синтезируются по пути Кеннеди, в то время как по пути метилирования ФЭ происходит образование полиненасыщенных минорных видов, в сумме составляющих не более 1% от суммы ФХ. При этом, как видно по динамике включения D9-холина, 36:3 ФХ является одним из наиболее стабильных молекулярных видов, в то время как 36:4 ФХ быстро включается в дальнейшие модификации, связанные с обменом ацильных групп.

Другой альтернативный путь синтеза фосфолипидов у базидиальных грибов может быть обусловлен реакциями «переформатирования» экзогенных фосфолипидов, поглощенных из субстрата. Недавно проведенные эксперименты с использованием флуоресцентно-меченого ФХ (NBD-PC) показали, что растущие гифы активно поглощают меченый ФХ по периферии мицелия. Метка концентрируется неоднородно по поверхности гифы гриба: либо вдоль 20–100 мкм поверхности клетки у кончика гифы, либо в «hotspots» вокруг места будущего ветвления гифы. Зрелый мицелий слабее поглощает метку.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-04-01092) с привлечением оборудования ресурсных центров «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Методы анализа состава вещества» Санкт-Петербургского государственного университета. Методическая основа протокола анализа молекулярных видов ФХ и ФЭ разработана в ходе работы по проекту РНФ (№ 22-24-01152).

Литература

1. Harayama T., Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition // *Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. P. 281–296.
2. McMaster C.R. From yeast to humans – roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis // *FEBS Letters.* 2018. V. 592. P. 1256–1272.
3. Kotlova E.R., Senik S.V., Manzhieva B.S., Kiyashko A.A., Shakhova N.V., Puzansky R.K., Volobuev S.V., Misharev A.D., Serebryakov E.B., Psurtseva N.V. Diversity of ESI-MS based phosphatidylcholine profiles in basidiomycetes // *J Fungi (Basel).* 2022. V. 8(2): 177.
4. Senik S.V., Maloshenok L.G., Kotlova E.R., Shavarda A.L., Moiseenko K.V., Bruskin S.A., Koroleva O.V., Psurtseva N.V. Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes* // *Phytochemistry.* 2015. V. 117. P. 34–42.
5. Patton-Vogt J., de Kroon A.I.P.M. Phospholipid turnover and acyl chain remodeling in the yeast ER // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2020. V. 1865(1): 158462.

Оценка сезонной динамики генетического и таксономического состава бактериальных сообществ в пелагиали и литорали озера Байкал

*Краснопеев А.Ю., Букин Ю.С., Галачьянц А.Д., Потапов С.А.,
Тихонова И.В., Белых О.И.*

ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск,
krasnopeev@lin.irk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38336

Комплексные исследования пелагической и литоральной зон озера Байкал проводятся уже давно. Получены обширные знания о сезонной и межгодовой динамике численности бактерий, их пространственном распределении, выделены и описаны различные группы микроорганизмов (поставь ссылки). С помощью секвенирования поколения (NGS, Next Generation Sequencing) выявлено огромное разнообразие микроорганизмов в различных экотопах оз. Байкал, многие из которых некультивируемые (ссылки). В последнее время накоплены многочисленные данные о разнообразии микробных сообществ как морских, так и водных экосистем на основе результатов секвенирования библиотек ампликонов гена 16S рРНК. С использованием этого подхода показано высокое разнообразие планктонных, бентосных, симбиотических и других бактериальных сообществ в оз. Байкал.

Определение таксономического разнообразия сообществ является важным этапом экологических и мониторинговых исследований экосистем. В основном для таких работ используют так называемое ДНК-штрихкодирование, применяя технологии секвенирования нового поколения, а, именно, методы секвенирования «ампликонов» (ПЦР-продуктов, полученных в результате проведения полимеразной цепной реакции) и «shotgun» метагеномики (метод дробовика – секвенирования случайных фрагментов). Основные задачи такого анализа – идентификация таксонов организмов, генетических материалов которых находился в смеси ДНК, и определение показателей представленности таксонов – количества или доли прочтений, приходящихся на каждый таксон в исследуемом образце.

В данной работе мы анализировали состав и структуру бактериальных сообществ литорали (вблизи п. Большие Коты) и пелагиали (станция разреза, расположенная в 7 км от п. Листвянка) озера Байкал в течение года (трех биологических сезонов). С помощью линейного дискриминантного анализа LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) были определены таксоны-маркеры для каждого из сезонов, в течение которых велся мониторинг. В итоге, каждый месяц характеризовался своими маркерными флотипами, которые дают представление о процессах, происходящих в микробных сообществах в этот период. Так, в июне и июле подавляющее большинство маркерных флотипов принадлежали активным деструкторам органических веществ. Одни виды специализировались на белковых субстратах, другие – на углеводных. В августе практически все маркерные флотипы так или иначе были связаны с фототрофией, а, именно, присутствовали цианобактерии, осуществляющие оксигенный фотосинтез, и широкий ряд фотогетеротрофных микроорганизмов. В сентябре и октябре появились маркерные флотипы, отнесенные к сульфат- и железоредуцирующим микроорганизмам, метилотрофам, факультативным анаэробам; кроме того, встречались фототрофы и активные деструкторы органических веществ (табл. 1, 2).

Среди маркерных флотипов отмечено много таких, у которых был общий близкородственный гомолог в пелагиали и литорали. Это говорит о родстве планктонных сообществ поверхностных слоев озера Байкал. Наибольшее сходство между микробиомами пелагиали и литорали наблюдали в августе, когда маркерные флотипы бактериальных сообществ обеих станций были практически одинаковыми. Возможно, наблюдаемое явление вызвано максимальной стабильностью поверхностных слоев воды в этот период из-за отсутствия сильного волнового перемешивания, а также вследствие незначительного поступления аллохтонных микроорганизмов в литоральную зону с дождевыми (это же август) водами и из донных осадков.

Таблица 1

**Доминирующие таксоны – маркеры для каждого месяца в образцах,
отобранных в прибрежной зоне вблизи п. Большие Коты**

Phylum	Class	Genus	BLAST	Month
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingorhabdus	Sphingorhabdus planktonica	June
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Massilia	Massilia suwonensis	June
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Rhodoferax	Rhodoferax sp.	June
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter johnsonii	June
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas putida	June
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Luteolibacter	Luteolibacter gellanilyticus	June
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	GKS98_freshwater_group	Achromobacter panacis	July
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Luteolibacter	Luteolibacter luojiensis	July
Actinobacteriota	Actinobacteria	hgcI_clade	Candidatus Planktophila lacus	August
Actinobacteriota	Actinobacteria	Candidatus_Planktophila	Candidatus Planktophila sulfonica	August
Bacteroidota	Bacteroidia	Candidatus_Aquirestis	Candidatus Aquirestis calciphila	August
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobium_PCC-6307	Synechococcus sp.	August
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobium_PCC-6307	Cyanobium sp.	August
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Limnohabitans	Limnohabitans sp.	August
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	uncultured	Verrucomicrobiota uncultured	August
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	uncultured	Verrucomicrobiota uncultured	September
Bacteroidota	Kapabacteria	Kapabacteriales_ge	Candidatus Kapabacteria bacterium	October
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	SH3-11	Verrucomicrobiota uncultured	October

Таблица 2

**Доминирующие таксоны – маркеры для каждого месяца в образцах,
отобранных в пелагиали на станции в 7 км от п. Листвянка**

Phylum	Class	Genus	BLAST	Month
Actinobacteriota	Acidimicrobiia	CL500-29_marine_group	Ilumatobacter sp.	June
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingorhabdus	Sphingorhabdus planktonica	June
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Luteolibacter	Luteolibacter gellanilyticus	June
Actinobacteriota	Acidimicrobiia	CL500-29_marine_group	Ilumatobacter sp.	July
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacterium	Flavobacterium sp.	July
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Luteolibacter	Luteolibacter luojiensis	July
Actinobacteriota	Actinobacteria	Candidatus_Planktophila	Candidatus Planktophila sulfonica	August
Actinobacteriota	Actinobacteria	hgcI_clade	Candidatus Planktophila sp.	August
Bacteroidota	Bacteroidia	Candidatus_Aquirestis	Candidatus Aquirestis calciphila	August
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobium_PCC-6307	Synechococcus sp.	August
Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobium_PCC-6307	Cyanobium sp.	August
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	uncultured	Verrucomicrobia bacterium uncultured	August
Actinobacteriota	Acidimicrobiia	CL500-29_marine_group	Iamia sp.	September
Actinobacteriota	Acidimicrobiia	CL500-29_marine_group	Iamia sp.	September
Actinobacteriota	Acidimicrobiia	CL500-29_marine_group	Ilumatobacter fluminis	September
Actinobacteriota	Actinobacteria	hgcI_clade	Candidatus Nanopelagicus hibericus	September

Phylum	Class	Genus	BLAST	Month
Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales unclassified	Bacteroidetes bacterium uncultured	September
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	LD29	Verrucomicrobia bacterium uncultured	September
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Terrimicrobium	Terrimicrobium sacchariphilum	September
Bacteroidota	Kapabacteria	Kapabacteriales_ge	Kapabacteriales_ge	October
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Clade_III_ge	Candidatus Fonsibacter ubiquis	October
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Candidatus_Methylopumilus	Candidatus Methylopumilus universalis	October
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Chthoniobacter	Chthoniobacter flavus	October
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	uncultured	Verrucomicrobia bacterium uncultured	October
Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	SH3-11	Bacterium SH3-11 uncultured	October

Основное отличие микробиомов пелагиали и литорали – это большая представленность актинобактерий в глубоководной зоне озера; во все сезоны здесь обнаружены собственные маркерные флотипы этой фило. Предположительно, это связано с более подходящими гидрофизическими и гидрохимическими условиями в пелагиали, в частности, отсутствие взвеси, поднимающейся со дна, более высокой прозрачностью воды. Поскольку значительная часть актинобактерий – фотогетеротрофы, для них важно большое количество солнечного света.

Изменение вирулентных свойств микросимбионтов *Lactobacillus spp.* в ассоциации с простейшими *Blastocystis hominis in vivo*

Красноперова Ю.А.¹, Мехманова С.Ш.¹, Хуснатднова Е.А.²

¹Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова, sevinchik11@mail.ru

² Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38337

Анализ направленности межмикробных взаимоотношений ассоциативных микросимбионтов позволяет прояснить патогенез широкого спектра заболеваний, правильно оценить происхождение тех или иных аномалий в структуре микросимбионтов, приводящих к изменению их типичных или проявлению новых биологических свойств [1].

Цель работы

Изучение вирулентных свойств штаммов *Lactobacillus spp.* при ассоциативном взаимодействии с простейшими *Blastocystis hominis in vivo*.

Материалы и методы

Штаммы бактерии *Lactobacillus spp.* и простейших *Blastocystis hominis* получали из фекалий 396 пациентов в возрасте от 20 до 60 лет, проходящих обследование на кишечный дисбиоз в условиях дневного стационара Муниципального учреждения здравоохранения Городской поликлиники № 5 г. Ульяновска.

В качестве контрольных использовали 112 эталонных штаммов лактобактерий НК1 и КЗШ24, депонированных в ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Степень вирулентности простейших бластоцист определяли путем внутрибрюшинного введения белым мышам (массой 17.4±1.5 г) 0.5 мл взвеси культуры изучаемых микроорганизмов, выращенной на среде Suresh [2]. В работе использовали праймеры к нескольким генам, определяющим способность к образованию фимбрий 1-го типа, фимбрий S и P типа, бактериального адгезина интимина и гемолизина. Праймеры синтезированы в НПФ «ДНКтехнология» (Россия). Выделение бактериальной ДНК проводили по методу Boom et al. [3]. Подбор праймеров и температуры отжига осуществляли при использовании пакета программ “Lasergene” (США). Регистрацию результатов ПЦР осуществляли путем электрофоретического разделения продуктов амплификации на окрашенном бромистым этидием в агарозном геле. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью компьютерной программы Vector NTI Suite (США).

Результаты

Проведенный анализ на кишечный дисбиоз показал, что при усилении вирулентности выявляемых бластоцист статистически достоверно снижалось количество лактобактерий со значения $\lg 9.3 \pm 0.5$ КОЕ/г до $\lg 3.8 \pm 0.8$ КОЕ/г ($p = 0.001$). Коэффициент корреляции составил $r = -0.8$. Тестирование штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из ассоциации с авирулентными бластоцистами, продемонстрировало, что искомые ампликоны выявлялись только при использовании праймеров к *fimA*-гену. Частота встречаемости данного ампликона составила 19.1% (у эталонных штаммов – 0%, $p = 0.001$). В данной фенотипической группе ни в одном случае не выявлены генетические детерминанты к другим генам. Изучение частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих синтез фимбрий P, S и 1-го типа, интимина и гемолизина у бактерий *Lactobacillus* spp., выделенных из ассоциации с умеренновирулентными бластоцистами показало, что достоверно чаще других регистрировались генетические детерминанты, обеспечивающие синтез фимбрий 1- и S-типов: *fimA* – 59.8; *sfaA* – 21.5, *sfaG* – 19.6% соответственно ($p = 0.001$). Положительные результаты были зафиксированы и в отношении других изучаемых детерминант. Из 189 протестированных штаммов с праймерами к *hlyB* гену, положительный сигнал был получен только с 7 культурами (3.7%). В общем пуле контрольных штаммов положительные сигналы не выявлены.

При ассоциативном взаимодействии *in vivo* лактобактерий с высоковирулентными бластоцистами отмечено увеличение частоты образования ампликонов генетических детерминант пилеобразования по сравнению с предыдущими группами в среднем в 2 раза, что можно рассматривать как стресс-индукцию адаптационных механизмов к выеданию хищниками-простейшими. Из 134 протестированных штаммов с праймерами к *eaeA* гену, положительный сигнал был получен только с 14 культурами (7.4%). Динамика регистрации гена токсинообразования увеличилась в 2.2 раза.

Выводы

После совместного культивирования лактобактерий с бластоцистами различной степени вирулентности, возрастает частота встречаемости генетических детерминант факторов патогенности *Lactobacillus* spp. Простейшие бластоцисты выступают в роли экологического стрессового фактора внутри ассоциативной микросистемы, поскольку их присутствие в кишечном консорциуме приводит к усилению факторов адгезивности, колонизации и токсинообразования, что было подтверждено положительной динамикой выявления генетических детерминант, ответственных за экспрессию данных факторов вирулентности.

Литература

1. Abe N., Wu Z., Yoshikawa H. Molecular characterization of Blastocystis isolates from primates // Veterinary Parasitology. 2003. V. 113. P. 321–325.
2. Suresh K., Ng G.C., Ramachandran N.P., Ho L.C., Yap E.H., Singh M. In vitro encystment and experimental infections of Blastocystis hominis // Parasitology Research. – 1993. – V. 79. – P. 456–460.
3. Boom R., Sal C.J., Salimans M.M., Carniel E., Vandec B., Rainolds C. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J Clin Microbiol. – 1988. – V. 28. – P. 495–503.

Сравнительный геномный анализ вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Ставропольского края

Красовская Т.Л.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
t.krasovskaya@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38338

Сегодня лейкоз крупного рогатого скота по-прежнему остается острым инфекционным заболеванием, широко распространенным во все мире. Уровень инфицированности коров колеблется от 30 до 70% в зависимости от региона. Основной этиологический агент этого заболевания – РНК-содержащий вирус, который относится к роду дельтаретровирусов (лат. *Deltaretrovirus*), семейству ретровирусов (лат. *Retroviridae*), сходен в морфологическом отношении с возбудителями лейкоза у животных других видов.

Для проведения сравнительного геномного анализа ставропольских изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей высоко консервативного фрагмента локуса env-гена изолятов, полученных с исследуемой территории (длина фрагмента 444 п.н.). Из международной базы данных Genbank была выбрана нуклеотидная последовательность наиболее близкого по структуре изучаемого локуса изолята HQ902258.1 из Белоруссии (степень сходства 99%), которая была использована в качестве референсной.

В ходе исследований была выявлена 31 нуклеотидная замена в анализируемом локусе, что в 11 случаях привело к миссенс-мутациям, из которых различают 2 транверсии и 9 транзиций. Наибольший интерес представляет мутация A → G в позиции 104, сопровождающаяся соответствующей аминокислотной заменой (N → D). Она характерна для нуклеотидных последовательностей env-гена всех изученных изолятов Ставропольского края.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности ДНК-локуса env одного изолята, выделенного в хозяйстве Труновского района позволил выявить пять крупных специфичных делеций, нехарактерных для других образцов и референтных штаммов, что явилось основанием к отнесению указанного изолята к атипичным.

Построение филогенетического дерева на основании изученных последовательностей фрагмента env-гена позволило провести типирование данных изолятов ВЛКРС в соответствии с современной международной классификацией.

Структура дендрограммы дает возможность четко различить две ветви изолятов вируса лейкоза, циркулирующих на территории Ставропольского края (рис. 1). Одну ветвь образуют 96,55% исследуемых образцов, при этом 27 из них принадлежат к большой группе, к которой отнесены штамм из Франции (M35238) и референтный штамм из Белоруссии (HQ902258.1), представляющие генотип 4 (степень родства 98-99%). Структура описываемой ветви включает несколько групп и составляющие их отдельные клады, которые составляют изоляты, полученные из конкретных животноводческих хозяйств. Помимо этого, один изолят (9157_U) из хозяйства Новоалександровского района составляет отдельную кладу с изолятом из Бразилии AY185360, что свидетельствует, вероятно, о его генетическом сходстве с представителем генотипа 6.

Атипичный изолят (29260) из хозяйства Труновского района образовал на дендрограмме отдельный кластер, изолированный от других, рассмотренных ранее изолятов и референтных образцов, что является следствием уникальной первичной структуры изучаемого ДНК-локуса, в котором делетировано не менее 65% нуклеотидных остатков.

Таким образом, результаты проведенного сравнительного геномного анализа подтвердили, ставропольские изоляты вируса лейкоза крупного рогатого скота принадлежат к 4 и 6 генотипам, что соответствует данным, описанным в литературе.

По итогам работы было проведено депонирование нуклеотидных последовательностей в международную базу данных Genbank десяти фрагментов гена env изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота в Ставропольском крае, присвоены регистрационные номера KP308390, KR007590–KR007598.

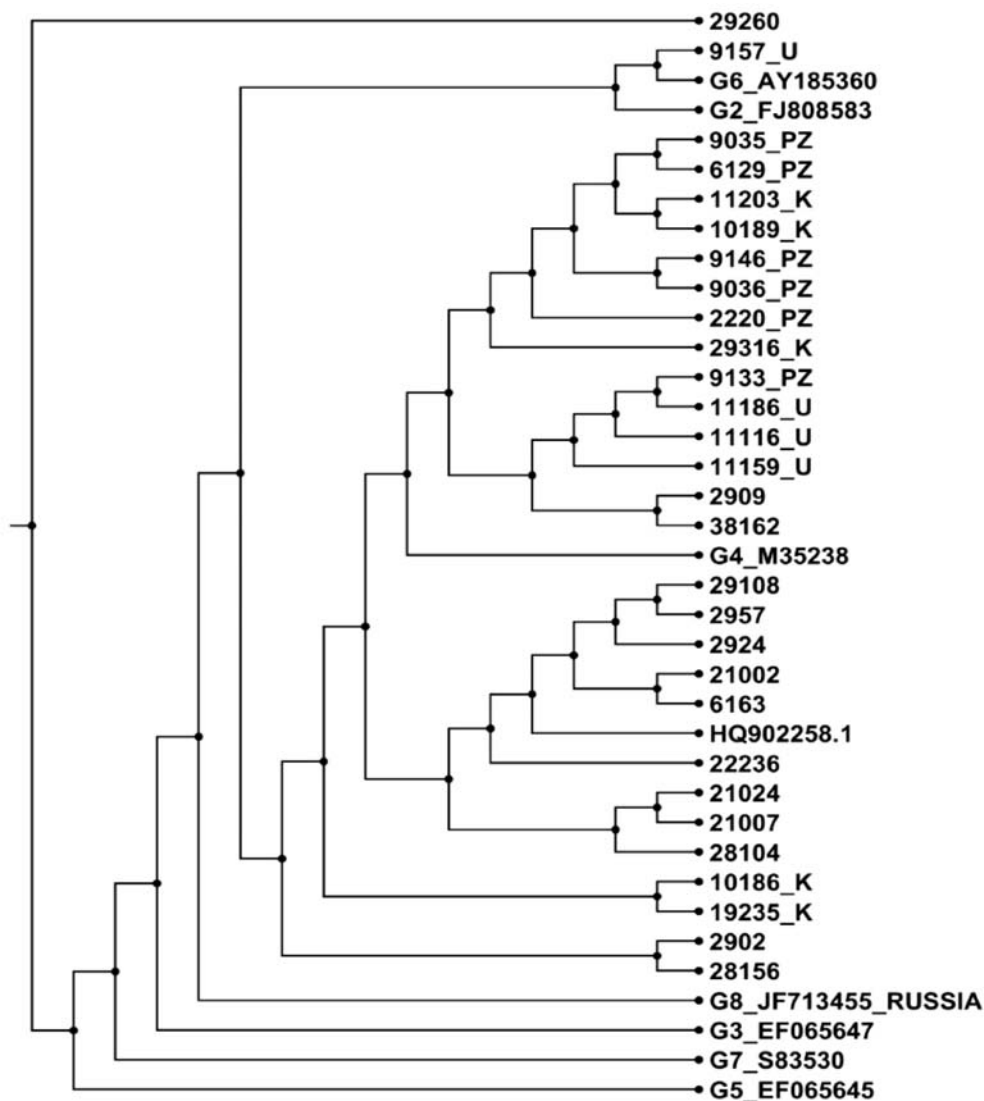


Рис. 1. Кластерный анализ 37 штаммов, представляющих референтные (n = 8) штаммы и исследуемые изоляты (n = 29) на основе результатов секвенирования локуса env ВЛКРС

Литература

1. *Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J.* Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing // *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001. Vol. 114, # 7–8. P. 252–256.
2. *Rola-Luszczak M.* The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny / *M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury, J. Kuzmak* // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. # 3. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058705>.

Транскриптомный подход для поиска новых перспективных антимикробных ферментов *Lysobacter capsici* VKM В-2533^T

Кудрякова И.В.¹, Афошин А.С.¹, Тарлачков С.В.¹, Леонтьевская Е.А.¹,
Сахарова С.А.², Галемина И.Е.^{1,3}, Зеленов Д.В.^{1,3}, Леонтьевская Н.В.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино,
kudryakovairina@yandex.ru

² Московский политехнический университет, Москва

³ Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38339

В ИБФМ РАН изучаются бактерии рода *Lysobacter*, продуцирующие различные литические агенты. Установлено, что культуральная жидкость штаммов *L. capsici* VKM В-2533^T и *Lysobacter* sp. XL1 обладает мощной антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий. При этом штамм *L. capsici* VKM В-2533^T обладает также мощной антифунгальной активностью. Данные физиологические особенности этих штаммов определяют перспективность поиска новых антимикробных агентов, что и определило цель данной работы.

Антимикробный потенциал изучаемых штаммов *Lysobacter* может быть связан с продукцией бактериолитических ферментов, антибиотиков, а также со способностью образовывать внешнемембранные везикулы, которые могут нести в своем составе каждый из этих классов соединений. Из культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 ранее в лаборатории были выделены пять бактериолитических ферментов (Л1–Л5). В то время как бактериолитические ферменты *L. capsici* VKM В-2533^T не были выделены до настоящего времени. Нами было установлено, что оптимальными средами для проявления бактериолитической активности *L. capsici* VKM В-2533^T являются среды RM, SYM, KSP. Среда RM и KSP были выбраны для поиска и выделения бактериолитических ферментов *L. capsici* VKM В-2533^T. Было выделено шесть бактериолитических ферментов, включая β-литическую протеазу, способную гидролизовать живые клетки клинического изолята *Staphylococcus aureus* 55 (MRSA) (минимальная ингибирующая концентрация составляет – 2,85 мкг/мл). При анализе фракций в процессе очистки бактериолитических ферментов было обнаружено наличие и других антимикробных агентов. С целью их поиска и идентификации мы провели транскриптомное исследование при культивировании штамма *L. capsici* VKM В-2533^T на средах RM и SYM, на которых штамм проявлял антибактериальную и антифунгальную активность. В качестве контроля мы использовали среду 5/5, при культивировании на которой антимикробная активность отсутствует. В результате был обнаружен целый пул генов, увеличивших свою экспрессию, среди которых были как уже известные нам бактериолитические ферменты (в том числе, β-литическая протеаза), так и неизученные ранее гидролитические ферменты, относящиеся к разным классам протеаз и гликозил-гидролаз, среди которых были выбраны гены, кодирующие сериновую протеазу Serp3 (UOF12968.1), сериновую протеазу Serp5 (UOF13168.1), гликозилгидролазу GluB (UOF13513.1), гликозилгидролазу GluC (UOF16369.1) и хитиназу CHI1 (UOF12917.1). На основе ранее разработанной нами гомологичной системы экспрессии с использованием в качестве экспрессионного вектора pBBR1-MCS5 с промотором бактериофага T5 и экспрессионного штамма *L. capsici* VKM В-2533^T были экспрессированы гены отобранных белков. Для каждого из целевых белков была разработана схема очистки с учетом pI белков и с использованием колоночного метода хроматографии (аффинная хроматография, ионообменная хроматография и гель-фильтрация). В результате были получены бактериолитический белок Serp5, Serp3, GluB, GluC и CHI1 в электрофоретически гомогенном виде, что также было подтверждено методом MALDI-TOF. Были определены оптимальные условия гидролиза субстратов белками Serp3 и Serp5: гидролиз автоклавированных клеток *S. aureus* 209P для Serp5 – 10 mM Na-фосфатный буфер, pH = 8.0 при температуре реакции 80 °C, удельная активность составляет 1115 ЛЕ/мг (при 37 °C); для Serp3 – 5 mM Na-ацетатный буфер, pH 5.0 при температуре реакции 80 °C, удельная активность составляет 74 ЛЕ/мг (при 37 °C). При этом кислые условия являются нетипичными

для работы бактериолитических белков, что представляет интерес для дальнейшего исследования белка Serp3. Для Serp5 установлен спектр гидролиза белковых и бактериальных субстратов: азофибрин, казеин, эластин, гемоглобин, живые клетки *S. aureus* 209P, *Micrococcus luteus* Ac-2230^T и *Kocuria rosea* Ac-2200^T. Выявленные особенности Serp5 делают его перспективным агентом для конструирования на его основе антимикробных препаратов.

Ранее из активного штамма *Lysobacter* sp. XL1 был получен малоактивный штамм *Lysobacter* sp. XL2. Для поиска новых литических агентов из XL1 мы применили метод сравнительного транскриптного анализа этих штаммов. В результате у XL1 были обнаружены гены, уровень экспрессии которых был выше по сравнению с малоактивным штаммом. Особый интерес представляют гены гидролитических ферментов, функциональный статус которых предстоит установить в дальнейшем.

Таким образом, проведенные исследования открывают широкий горизонт перспектив для поиска, выделения новых бактериолитических агентов и конструирования на их основе антимикробных препаратов нового поколения.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ (проект № МК-1864.2022.1.4).

N-концевые ацетилтрансферазы бактерии *Thermus thermophilus*: идентификация и изучение физико-химических свойств

Кудряшов Т.А.¹, Трунилина М. В.^{1,2}, Болдаевский И. С.^{1,2}, Соколов А.С.¹,
Локтюшов^oЕ.В.¹, Вологжанникова А.А.¹, Шевелева М.П.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН),
kudryashovtimm@gmail.com

² Пушинский Государственный естественно-научный институт, Пушкино

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38340

N-концевое ацетилирование (Nt-Ac) является одной из самых распространенных ко/посттрансляционных модификаций белков (до 90% протеома эукариот ацетилировано) и оказывает существенное влияние на стабильность их структур и регуляцию биологических функций [1]. Nt-Ac осуществляется благодаря действию специфических ферментов – N-концевых ацетилтрансфераз (NAT), которые катализируют перенос ацетильной группы от ацетил-коэнзима А на N-концевую аминокислотную группу белков. В настоящее время известно восемь NAT эукариот, различающихся по составу субъединиц и субстратной специфичности [2]. На протяжении долгого времени считалось, что Nt-Ac белков характерно в основном для эукариот, а в прокариотах активны три NAT и лишь пять белков подвергаются ацетилированию. Однако, геномные и протеомные исследования последних лет показали, что от 13 до 20% белков бактерий и архей подвергаются данной модификации, а геномы отдельных организмов содержат от двух (у архей) до 72 открытых рамок считывания (ОРС) (*Streptomyces*), кодирующих ацетилтрансферазы (AT) [3].

Несмотря на активное изучение NAT и роли N-ацетилирования в бактериях и археях, исследования, связанные с NAT термофильных организмов, ограничены несколькими работами [4, 5]. Учитывая важность Nt-Ac в поддержании структуры и функции белков, регуляции метаболизма бактерий, а также применения NAT бактерий для Nt-Ac рекомбинантных белков и пептидов, на сегодняшний день актуальна задача нахождения новых NAT, отличающихся субстратной специфичностью, устойчивых к высоким температурам и денатурирующим агентам. В этой связи перспективным представляется поиск, клонирование и изучение свойств NAT из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

С использованием методов биоинформатики проведен анализ генома *T. thermophilus* HB8. Из 14 аннотированных AT было отобрано 6 предполагаемых NAT, которые имеют длину от 140 до 205 аминокислот, содержат характерное чередование элементов вторичных структур (GNAT домен) и консенсус

аминокислот, связывающих ацетил-коэнзим А. ОРС предполагаемых NAT были клонированы в вектор pET-29 и наработаны в клетках *E. coli* BL21(DE3). При помощи афинной хроматографии на Ni-NTA агарозе были получены рекомбинантные ферменты, несущие на С-конце 6 остатков гистидина. Методом динамического светорассеяния было установлено, что фермент, кодируемый геном TTNA1209, является гомодимером. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что TTNA1209 является термостабильным белком, с серединой теплового перехода 72 ± 1 °С. Проводятся исследования субстратной специфичности фермента и пределов его устойчивости к денатурирующим агентам.

Литература

1. Deng S. and R. Marmorstein, «Protein N-Terminal Acetylation: Structural Basis, Mechanism, Versatility, and Regulation», *Trends Biochem Sci*, vol. 46, pp. 15-27, Jan 2021.
2. Varland S., Osberg C., and Arnesen T. «N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects». *Proteomics*, vol. 15, pp. 2385-2401, 2015.
3. Burckhardt R.M. and Escalante-Semerena J.C. «Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 84, May 20 2020.
4. Mackay D.T., Botting C.H., Taylor G.L., and White M.F. «An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in *Sulfolobus solfataricus*». *Mol Microbiol*, vol. 64, pp. 1540-8, Jun 2007.
5. Ma C., Pathak C., Jang S., Lee S.J., Nam M., Kim S.J., Im H., and Lee B.J. «Structure of *Thermoplasma volcanium* Ard1 belongs to N-acetyltransferase family member suggesting multiple ligand binding modes with acetyl coenzyme A and coenzyme A». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1844, pp. 1790-7, Oct 2014.

Анализ экспрессии одиннадцати генов SWEET в растительно-микробной системе *Medicago lupulina* и *Rhizophagus irregularis* в условиях внесения дозы фосфора в субстрат

Кудряшова Т.Р.^{1,2}, Крюков А.А.², Горбунова А.О.², Иванченко О.Б.¹, Юрков А.П.²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, tahacorfu@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38341

На сегодняшний день изучение арбускулярной микоризы (АМ), как одного из широко распространенных видов симбиоза, актуально ввиду тенденции к созданию высокопродуктивных растительно-микробных систем (РМС). Арбускулярная микориза задействована в процессах почвообразования, круговороте веществ, устойчивости экосистемы, адаптации растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. В связи с этим становится необходимым выявление генов-маркеров симбиотической эффективности АМ. Согласно литературным данным специфичные гены для данного симбиоза могут быть обнаружены среди транспортеров углеводов из семейства SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters). В первую очередь среди белков I и III клады (всего IV, у млекопитающих V). Транспортеры SWEET являются весьма вариабельными, при изменении внешних условий может возникать множество изоформ, обладающих различными функциями. Транспортеры углеводов у растений играют значительную роль в их продуктивности, поскольку с их помощью координируются и осуществляются потоки сахаров от листьев к органам потребления (семя, плод, цветок и корень), а также с их помощью регулируется часть обмена питательными веществами с микроорганизмами ризосферы (бактериями и грибами), что позволяет формировать симбиотические отношения. Современные мировые тенденции к получению экологически безопасных продуктов лишь подтверждают, что бу-

дущее биологического земледелия невозможно без экосистемного подхода к ведению сельского хозяйства и без знаний, о генетическом контроле эффективного взаимодействия партнеров симбиоза в РМС.

Цель работы

Целью работы явилась оценка уровней экспрессии одиннадцати генов углеводных транспортеров SWEET при развитии АМ-симбиоза формируемого у *Medicago lupulina* с *Rhizophagus irregularis* в условиях среднего уровня доступного для питания растений фосфора в субстрате (Рд) – 58,5 мг P₂O₅/кг.

Материалы и методы

Люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L. subsp. vulgaris Koch), а именно селектированная экологически облигатно микотрофная линия MIS-1. Растения данной линии проявляют карликовость в отсутствии инокуляции АМ-грибом и низком доступным для питания уровнем фосфора в субстрате. Для инокуляции использован эффективный, на множестве видов растений, штамм RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis* (ранее известный как *Glomus intraradices* Shenck&Smith; шт. CIAM8 из коллекции института – ВНИИСХМ). Исследование проводили, используя вегетативный метод. Первый съем растений для анализа проводили на 21 сутки от посадки, последующие – через каждые 5–6 суток в ключевые стадии онтогенеза люцерны. Растительный материал растирали в жидком азоте. РНК из растительного материала выделена с применением Тризольного метода. Синтез кДНК проведен с использованием набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase в соответствии с протоколом производителя набора (Thermo Scientific). Изменения экспрессии генов оценены с помощью метода количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением Термоциклера реального времени BioRad CFX-96 (BioRad, USA) и использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I. Параметры циклов амплификации представлены на рис. 1. Оценка специфичности амплификации проведена с использованием анализов кривой плавления.

Изменения уровня экспрессии гена интереса в опыте сравнивалась с уровнем экспрессии данного гена в контроле, анализ проведен с помощью 2^{-ΔΔCT} метода. Уровни генной экспрессии нормализованы с помощью выбранного, в результате ранее проведенных исследований, референсного гена – актина.

Результаты работы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инокуляция растений *M. lupulina* штаммом АМ-гриба *R. irregularis* RCAM00320 (изолят был отобран, в результате скрининга исследуемых ранее

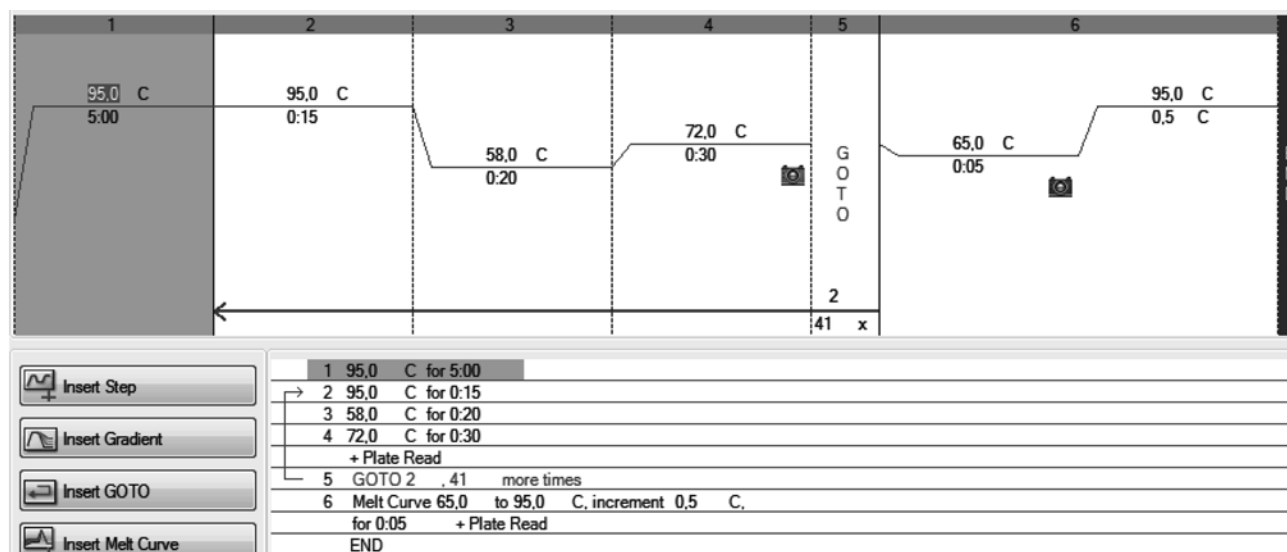


Рис. 1. Протокол проведения ПЦР-РВ

АМ-грибов, как эффективный) повышает продуктивность надземной биомассы растений и ускоряет прохождение фаз их развития у растений в условии среднего уровня фосфора в субстрате. Оценка экспрессии генов показала, что генами кандидатами на специфическую экспрессию в листьях микоризованного растения-хозяина при среднем уровне Рд в субстрате являются: *MISWEET1a*, *MISWEET1b*. Гены кандидаты на специфическую экспрессию в корнях представлены следующим списком: *MISWEET1a*, *MISWEET1b*, *MISWEET12*, *SWEET3c*. Среди них абсолютное лидерство за геном *MISWEET1b*, который с уверенностью можно считать маркером симбиотической эффективности со специфической экспрессией для эффективного развития АМ-симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* как в условиях низкого так и среднего уровня Рд в субстрате. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что специфические для АМ гены семейства SWEET могут быть найдены среди генов клады I и III.

Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, РФФИ №20-016-00245, а также РФФ №22-16-00064.

Литература

1. Транспортёры сахаров семейства SWEET и их роль в арбускулярной микоризе / А.А. Крюков, А.О. Горбунова, Т.Р. Кудряшова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – № 7. – С. 754–760. – DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251 10.18699/VJ21.086.
2. Yurkov A.P., Puzanskiy R.K., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Jacobi L.M., Kozhemyakov A.P., Romanyuk D.A., Aronova E.B., Avdeeva G.S. et al. The Role of *Medicago lupulina* Interaction with *Rhizophagus irregularis* in the Determination of Root Metabolome at Early Stages of AM Symbiosis. *Plants* 2022, 11, 2338.
3. Анализ экспрессии нескольких SWEET-генов транспортёров сахаров у *Medicago lupulina* в процессе развития эффективной арбускулярной микоризы в условии стресс-фактора / Т.Р. Кудряшова, А.Е. Калинина, П.В. Филатов [и др.] // VII Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: Сборник тезисов конференции, Пушино, 06–09 декабря 2021 года / Под редакцией Т.А. Решетиловой. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство ГЕОС», 2021. – С. 162–163.

Геномный анализ ризосферного штамма *Pseudomonas protegens* P4-2, способного стимулировать рост растений и деградировать n-алканы

Кузнецов А.В.¹, Сиунова Т.В.², Анохина Т.О.², Михайлов П.А.¹, Пунтус И.Ф.²

¹ Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушино, puntus66@mail.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38342

Бактерии-деструкторы углеводов нефти довольно легко выделяются из загрязненных почв. Для восстановления экосистемы использования биопрепаратов только на основе микроорганизмов-деструкторов часто не хватает. Применение методов фиторемедиации требует внесение ризосферных микроорганизмов для обеспечения здоровья растений, поскольку в загрязненных почвах доминируют плесневые грибы. PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) рода *Pseudomonas* способны стимулировать рост растений за счет синтеза фитогормонов, улучшения минерального питания растений и защиты их от фитопатогенов, продуцируя антибиотики, сидерофоры, цианид водорода и т.д. Очень редко встречаются бактерии-деструкторы, проявляющие PGPR свойства.

Поэтому целью работы был поиск микроорганизмов, сочетающих как деградационные, так и фитостимулирующие свойства. Из 12 штаммов PGPR *Pseudomonas* были выбраны два штамма, обладающих наиболее высокой скоростью роста в минеральной среде с *n*-гексадеканом – *P. protegens* P4-2 и *P. fluorescens* OV29. Исследование кинетики роста штаммов показало, что при культивировании на гексадекане они синтезировали биоПАВ: поверхностное натяжение культуральной среды снижалось с 72 до 45 мН/м.

Штамм *P. protegens* P4-2 был выделен из образцов ризосферы мятлика лугового, отобранных на территории Московской области, г. Пущино, 2014 г. Штамм способен продуцировать ауксины, растворять неорганические фосфаты и подавлять рост ряда фитопатогенных грибов и бактерий (1). Гены, ответственные за синтез антибиотически активных соединений, продуцируемых указанным штаммом, до настоящего времени описаны не были.

Секвенирование генома штамма *P. protegens* P4-2 было выполнено с использованием технологий Oxford Nanopore и Illumina. Размер генома составил 6 952 865 п.н. Для поиска интересующих нас генов использовали базу данных NCBI и программу BLAST. В качестве ближайших родственников были взяты штаммы *P. protegens* JUb28 и *P. protegens* Pf-5.

P. protegens Pf-5 – комменсальная бактерия растений, обитающая в ризосфере и продуцирующая вторичные метаболиты, подавляющие широкий спектр возбудителей заболеваний растений (2). Геном Pf-5 размером 7,07 Мб является самым большим геномом бактерий р. *Pseudomonas*, секвенированным на сегодняшний день. Он состоит из одной круговой хромосомы с 6144 предсказанными генами. Ранее в геноме *P. protegens* Pf-5 было найдено 9 кластеров, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, участвующих в поддержании здоровья растений. Штамм продуцирует пиолютеорин и 2,4-диацетилфлороглюцин, пирролнитрин, цианид водорода, два сидерофора (пиовердин и пиохелин), а также 3 новых неизученных соединения: новый циклический липопептид, который похож на циклические липопептиды группы вискозина, новый поликетид, новый нерибосомальный пептид. Липопептиды, продуцируемые некоторыми штаммами *Pseudomonas* spp., обладают поверхностно-активными (био-ПАВ) и антибиотическими свойствами, что может способствовать биологической борьбе с болезнями растений.

В геноме штамма *P. protegens* P4-2 мы обнаружили 9 кластеров вторичных метаболитов, 8 из которых были такими же как в геноме *P. protegens* Pf-5. Поиск кластера генов нового циклического липопептида (вискозинподобного) в штамме *P. protegens* P4-2 показал, что в нем присутствуют только транспортные и регуляторные гены, которые имеют высокое сходство у обоих штаммов, но гены нерибосомальных пептидсинтетаз для биосинтеза в геноме *P. protegens* P4-2 отсутствуют. Однако мы обнаружили гены биосинтеза липопептида артрофактинового типа. Сходство аминокислотных последовательностей генов биосинтеза этого липопептида для штаммов *P. protegens* P4-2 и Pf-5 очень высокое (91–99%). Липопептиды вискозин и артрофаксин являются эффективными поверхностно-активными циклическими липопептидами.

Проанализирован кластер генов биосинтеза 2,4-диацетилфлороглюцина. Обнаружено, что кластер сходен с кластером этого же соединения в штамме *P. protegens* Pf-5. Идентичность белковых последовательностей генов биосинтеза 2,4-диацетилфлороглюцина в *P. protegens* P4-2 и *P. protegens* Pf-5 очень высокая (93–100%). Единственное отличие – это направление экспрессии некоторых генов.

Для поиска генов биодegradации алканов у бактерий рода *Pseudomonas* использовали базу данных NCBI и программу BLAST. Кластеры генов биодegradации штамма *P. putida* GPo1 были взяты для поиска таковых в геномах штаммов *P. protegens* Pf-5 и *P. protegens* P4-2. Результат сравнения аминокислотных последовательностей генов биодegradации *n*-алканов штамма *P. putida* GPo1 и *P. protegens* P4-2 и Pf-5 показал их низкое сходство (30–54%).

Литература

1. Суцнова Т.В., Анохина Т.О., Сизова О.И., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кочетков В.В., Боронин А.М., Patil S.G., Chaudhari A.B. Штаммы PGPR *Pseudomonas*, перспективные для создания биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений. Биотехнология. 2017. Т. 33. № 2. С. 56–67. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/0234-2758-2017-33-2-56-67.
2. Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S., Mavrodi D.V., DeBoy R.T., Seshadri R., Ren Q., Madupu R., Dodson R.J., Durkin A.S., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Sullivan S.A., Rosovitz M.J., Gwinn M.L., Zhou L.,

Роль PAS-домена сенсорной гистидинкиназы Hik33 в регуляции стрессовых ответов у *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L

Леусенко А.В., Миронов К.С., Лось Д.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва,
ankenn-7@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38343

PAS (Per-ARNT-Sim) домен – это широко распространенная функциональная часть структуры белков, встречающихся у представителей всех трех царств жизни – архей, прокариот и эукариот. К белкам, в которых идентифицирован PAS домен, принадлежат гистидин- и серин/треонининовые протеинкиназы, хемо- и фоторецепторы, фосфодиэстеразы, ионные каналы, белки, управляющие циркадными ритмами, а также различные регуляторы клеточных ответов. Непосредственно сам PAS-домен отвечает за сенсорную и сигнальную функции этих белков; и, одновременно, принимает участие в формировании их третичной структуры (Stuffle et al., 2021). Hik33 – сенсорная гистидинкиназа, которая вместе с соответствующим регулятором ответа (Rre), составляет двухкомпонентную сигнальную систему. Hik33 принимает участие в регуляции экспрессии большого количества генов в ответ на холодовой, солевой и гиперосмотический стрессы (Los et al., 2010). Структура Hik33 включает, предположительно, три трансмембранных (TM1, TM2 и TM3), а также НАМР-, PAS- и киназный домены (согласно базе данных Uniprot). Ранее в экспериментах было показано, что при воздействии холодового стресса на клетки *Synechocystis* на свету индуцируется транскрипция Hik33-зависимых генов *hliB*, *ndhD2* и *desB*, в то время как в темноте индукции не происходит. Это указывает на явный светозависимый характер передачи сигнала холодового стресса через Hik33 (Mironov et al., 2012). Согласно литературным данным наиболее вероятным кандидатом на роль светового сенсора является PAS домен. В то же время Diego de Mendosa с коллегами в своих работах показал, что гистидинкиназа DesK (температурный сенсор у *Bacillus subtilis*) распознает изменение толщины мембраны при снижении температуры окружающей среды с помощью TM доменов. В настоящей работе для изучения функциональной роли отдельных доменов Hik33 в передаче сигнала были получены независимые мутанты *Synechocystis*, несущие эту гистидинкиназу с частично ($\Delta 2/3$ (TM1-TM3)) и целиком (Δ (TM1-TM3)) удаленными трансмембранными доменами, а также мутант с делецией по PAS-домену (Δ PAS).

С помощью ПЦР-РВ изучено изменение уровня экспрессии генов *hliB*, *lilA*, *ndhD2*, находящихся под контролем Hik33, и Hik33-независимых генов – *rbpA1* и *crhR* в мутантах с модифицированной гистидинкиназой в условиях холодового стресса при наличии или отсутствии света. Показано, что удаление всех трех трансмембранных доменов или PAS домена приводит к критическому снижению уровня экспрессии у генов *hliB*, *lilA*, и *ndhD2* как на свету, так и в темноте. Мутантный штамм с гибридным трансмембранным доменом, состоящим из N-концевой части TM1 и C-концевой части TM3 (или $\Delta 2/3$ (TM1-TM3)), индуцировал экспрессию Hik33-зависимых генов как и штамм дикого типа (рис. 1).

В случае Hik33-независимого гена *rbpA1* очевидно, что модификации в гистидинкиназе не приводят к значительным изменениям в уровне экспрессии.

Примечательно, что ген *crhR*, ранее считавшийся независимым от регуляции Hik33, по всей видимости, все же находится под частичным или опосредованным контролем данной гистидинкиназы.

Полученные данные говорят о том, что и трансмембранные домены и PAS домен являются критически важными модулями для функциональной активности Hik33. Результаты, полученные для мутант-

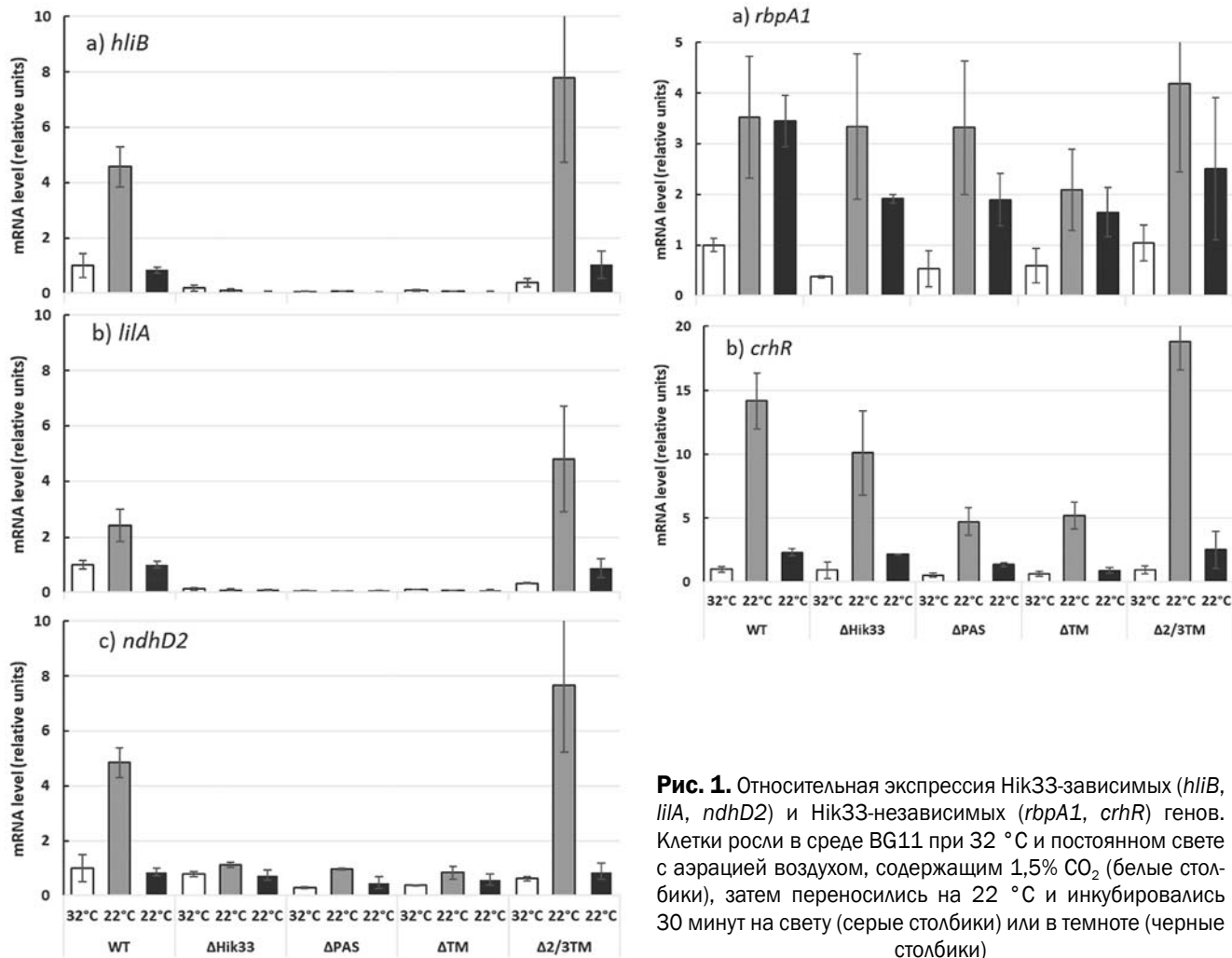


Рис. 1. Относительная экспрессия Hik33-зависимых (*hliB*, *lliA*, *ndhD2*) и Hik33-независимых (*rbpA1*, *crhR*) генов. Клетки росли в среде BG11 при 32 °С и постоянном свете с аэрацией воздухом, содержащим 1,5% CO₂ (белые столбики), затем переносились на 22 °С и инкубировались 30 минут на свету (серые столбики) или в темноте (черные столбики)

ных штаммов *Synechocystis* с Hik33 с полностью удаленными ТМ доменами или гибридным ТМ доменом, аналогичны результатам группы Diego de Mendosa для DesK в *Bacillus subtilis*, что согласуется с гипотезой универсального механизма распознавания холодового стресса.

Изучение механизмов получения и передачи сигналов гистидинкиназой Hik33 в настоящее время продолжается.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-74-30003.

Литература

1. Los D.A., Zorina A., Sinetova M., Kryazhov X., Mironov K, Zinchenko V.V. Stress Sensors and Signal Transducers in Cyanobacteria // Sensors. 2010. V. 10. P. 2386–2415.
2. Mironov K.S., Sidorov R.A., Trofimova M.S., Bedbenov V.S., Tsydendambaev V.D., Allakhverdiev S.I., Los D.A. Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis* // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. V. 1817. P. 1352–1359.
3. Stuffle E.S., Johnson M.S., Watts K.J. PAS domains in bacterial signal transduction // Current Opinion in Microbiol. 2021. V. 61. P. 8–15. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/j.mib.2021.01.004.

Синтетические опероны для исследования регуляции стрессовых ответов у цианобактерий

Леусенко П.А., Миронов К.С., Лось Д.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, gurfarm@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38344

Десатуразы жирных кислот (ЖК) – ферменты, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях в двойные связи в конкретном положении, тем самым увеличивая ненасыщенность ЖК (Los, Murata, 1998). От степени ненасыщенности ЖК зависит текучесть цитоплазматической мембраны, которая во многом определяет устойчивость клеток к стрессовым факторам. Исследования в этой области имеют био- и агротехнологическое значение, поскольку позволяют получать растения, устойчивые к неблагоприятным факторам окружающей среды (Maali-Amiri et al., 2010).

Для оптимизации изучения влияния ЖК-профиля на устойчивость к внешним стрессовым факторам мы создали новый интеграционный вектор pLPA7 (на основе pTrc99A) для трансформации цианобактерии *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Внесенные изменения генетической конструкции дали ряд преимуществ по сравнению с традиционно применяемыми интеграционными векторами, такими как pAM1303 (Andersson et al., 2000):

1. Возможность проводить сборку заданной конструкции на плазмиде в штамме *E. coli* с последующей трансформацией в целевой штамм, минуя этап переклонирования собранного оперона в интеграционный вектор.

2. Возможностью легкой замены участков интеграции в хромосому. Это открывает широкие возможности для смены как мест локации на хромосоме, так и смены целевого штамма.

3. Новый полилинкер (*Spe* I-*Hpa* I-*Mfe* I-*Eco* 53kl-*Sac* I-*Sac* II-*Bam*H I-*Bsu* 36I).

4. Система Bio-Bricks, основанная на использовании изокаудомеров эндонуклеаз рестрикции, упрощает последовательную сборку сложных генетических конструкций.

В данной работе для создания синтетических оперонов использовались гены десатураз ЖК *desA* (Δ^{12} -), *desB* (ω^3 - или Δ^{15} -) и *desD* (Δ^6 -десатураза) из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 в следующих комбинациях: *desA-desB*, *desA-desD*, *desA-desD-desB* и *desA* отдельно.

Впоследствии полученные векторы использовались для интеграции синтетических оперонов в хромосому цианобактерии *S. elongatus* PCC 7942, у которой имеется только одна Δ^9 -десатураза (*desC*). У всех мутантов наличие мРНК соответствующих генов десатураз было подтверждено с помощью ОТ-ПЦР, соответствующие профили ЖК были подтверждены методом газовой хроматографии.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9), а также при поддержке гранта РНФ № 21-74-30003.

Литература

1. Los D.A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // Biochim. Biophys. Acta 1998. V. 1394. P. 3–15. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/s0005-2760(98)00091-5
2. Maali-Amiri R., Yur'eva N.O., Shimshilashvili K.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Kuznetsova E.V., Tsydendambaev V.D., Trunova T.I., Los D.A., Salehi Jouzani G.R., Nosov A.M. Expression of acyl-lipid Δ^{12} -desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. P. 289–297. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1111/j.1744-7909.2010.00890.x
3. Andersson C.R., Tsinoemas N.F., Shelton J., Lebedeva N.V., Yarrow J., Min H., Golden S.S. Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria // Methods Enzymol. 2000. V. 305. P. 527–542. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/s0076-6879(00)05511-7.

Влияние температуры на экспрессию генов термофильного штамма *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666^Т при биоконверсии холестерина

Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Тарлачков С.В., Брагин Е.Ю., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
lobastova_t@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38345

Стероиды широко распространены в природе, и микроорганизмы, способные к их структурной модификации или полной деградации, весьма разнообразны. Однако до сих пор сообщалось об очень небольшом количестве термофильных микроорганизмов, способных разлагать или модифицировать природные стеринны (Лобастова и др., 2021). Ранее нами были выявлены гены, вовлеченные в катаболизм стериннов, у умеренно термофильной актинобактерии *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666^Т (Lobastova et al., 2021). Также было показано, что штамм *S. hirsuta* способен расти в диапазоне температур от 20 до 55 °С на богатой питательной среде (Lobastova et al., 2021). Изучение организации и регуляции генов, относящихся к пути катаболизма стериннов, проводилось и проводится преимущественно у мезофильных актинобактерий. Актуальным представляется изучение экспрессии генов термофильного штамма *S. hirsuta*, выращенного в присутствии и в отсутствие холестерина при разных температурах.

Выращивание культуры *S. hirsuta* и конверсию холестерина (1 мМ), проводили на минеральной среде с глицерином (3 г/л), дрожжевым экстрактом (1 г/л) и метилированным β-циклодекстрином (2.7 г/л), которую засеивали 3% инокулятом, выросшим на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 7, крахмал растворимый – 10, соевый пептон – 7, твин 80 – 0.5 (рН 7.0–7.2) в течение 48 часов при 50 °С и 200 об/мин. Холестерин вносили в среду до стерилизации. При полнотранскриптомном профилировании тотальную РНК выделяли с использованием «RNeasy Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Секвенирование полученных препаратов РНК осуществляли на секвенаторе Illumina NextSeq (Illumina, США). Анализ холестерина и продуктов биоконверсии проводили по ранее описанной методике (Lobastova et al., 2021).

При 30 °С отмечался медленный рост культуры *S. hirsuta*, лаг-период превышал 12 часов, при этом за 16 часов роста биомасса достигала значения 0.024 г/л (рис. 1). За тот же период времени при температуре 50 °С биомасса достигала 0.97 г/л, лаг-период был незначительным. За 20 часов культивирования биомасса достигала 0.35 и 1.2 г/л (по с.в.) при температуре 30 и 50 °С, соответственно (рис. 1).

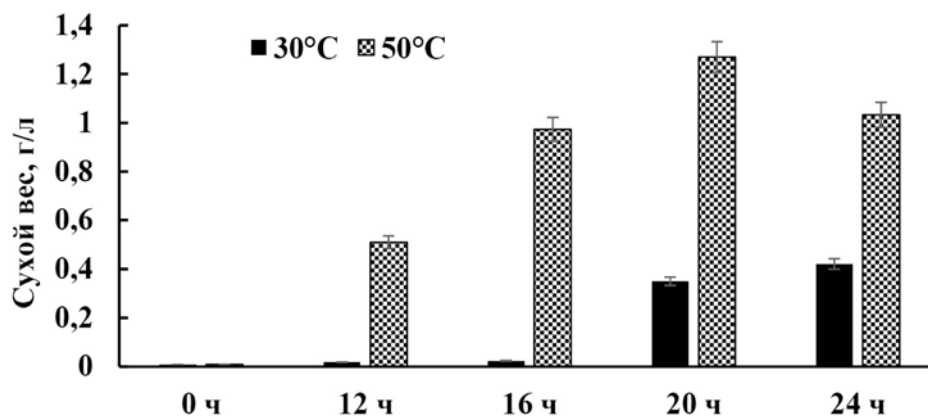
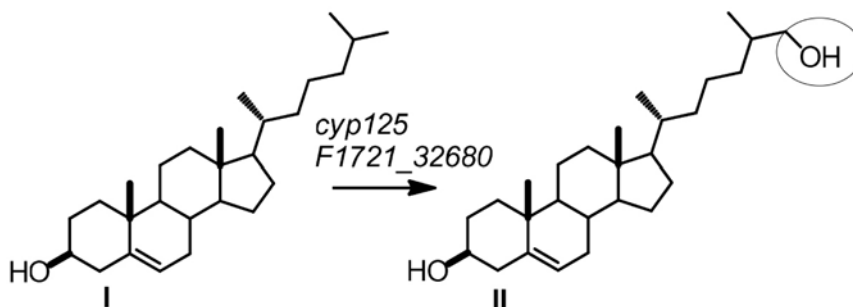


Рис. 1. Влияние температуры на рост термофильного штамма *S. hirsuta* на минеральной среде с глицерином и дрожжевым экстрактом

Рис. 2. Схема превращения холестерина при его биоконверсии термофильным штаммом *S. hirsuta* в изучаемых условиях. I – холестерин, II – 26-гидроксистерин



Основным продуктом трансформации холестерина штаммом *S. hirsuta* при 30 и 50 °С являлся 26-гидроксистерин (рис. 2).

Для выяснения влияния температуры на экспрессию генов стероидного катаболизма у термофильного штамма *S. hirsuta* получали транскриптомы клеток, выращенных на минеральной среде в присутствии холестерина (опыт) и в его отсутствие (контроль) при 30 и 50 °С. Дифференциальная экспрессия генов между парами опыт-контроль была подсчитана отдельно для 30 и 50 °С. Общее количество генов, повысивших и понизивших уровень экспрессии, приведено в табл. 1.

Таблица 1

Гены, изменившие уровень экспрессии при транскриптомном профилировании в ответ на холестерин при различной температуре инкубирования

Общее количество генов, изменивших уровень экспрессии в парах контроль (среда без стероида) – опыт (среда с холестерином)	Температура	
	30 °С	50 °С
Количество генов, увеличивших экспрессию	125	256
Количество генов, уменьшивших экспрессию	71	149

В изучаемых температурных условиях не обнаружено статистически значимого изменения экспрессии генов стероидного катаболизма на ранних этапах конверсии холестерина (16–20 часов). Количество генов «домашнего хозяйства», увеличивших экспрессию при 50 °С было в 2 раза больше, чем при 30 °С (табл. 1). Аналогичные результаты получены для генов, уменьшивших свою экспрессию при 50 и 30 °С, соответственно (табл. 1). При этом амплитуда изменения экспрессии генов, необходимых для поддержания основных клеточных функций, не превышала пяти раз по сравнению с контролем.

Результаты вносят вклад в понимание регуляции метаболизма термофильных актинобактерий при различных температурах и могут быть полезными при изучении биотехнологического потенциала таких культур в отношении стероидных соединений.

Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-00024).

Литература

1. Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Доновна М.В. VII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. М.: ГЕОС, 2021. С. 251-252. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.34756/GEOS.2021.17.38026
2. Lobastova T., Fokina V., Tarlachkov S., Shutov A., Bragin E., Kazantsev A., Donova M. Microorganisms, 2021, 9, 2554. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.3390/microorganisms9122554.

Применение метода SWATH в липидомике на примере исследования гетерогенного распределения фосфолипидов в культуре базидиального гриба *Flammulina velutipes*

Манжиева Б.С.¹, Сеник С.В.¹, Серебряков Е.Б.², Котлова Е.Р.¹

¹ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург,
bmanzhieva@binran.ru

²Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» СПбГУ, Санкт-Петербург

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38346

Липиды – разнообразная и повсеместно распространённая группа соединений, которые выполняют многие ключевые биологические функции – являются структурными компонентами клеточных мембран, служат единицами хранения энергии и участвуют в путях передачи внутриклеточного сигнала. Липиды можно в широком смысле определить как гидрофобные или амфипатические небольшие молекулы, которые полностью или частично состоят из двух «строительных блоков»: кетоацильных групп и изопреновых единиц. Огромное структурное разнообразие липидов возникает в результате биосинтеза различных комбинаций этих строительных блоков. Например, глицерофосфолипиды состоят из основной цепи глицерина, связанной с одной из примерно 10 возможных полярных групп, а также с двумя жирными ацильными или, реже, алкильными цепями, которые, в свою очередь, могут иметь более 30 различных молекулярных структур. Так, в клетках млекопитающих было обнаружено несколько сотен различных молекулярных видов глицерофосфолипидов.

Структурное разнообразие липидов грибов изучено значительно хуже. Определить совокупность всех молекулярных видов липидов в биологической системе помогает липидомика – крупномасштабное исследование структуры и функций полного набора липидов (липидома) в данной клетке или организме. Липидомика – относительно недавняя область исследований, которая была обусловлена быстрым развитием таких технологий как масс-спектрометрия (МС), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), флуоресцентная спектроскопия. Разработан ряд методов липидомики, основанных на разных масс-спектрометрических подходах, включая направленные (целевые) подходы, например, MRM (Multiple Reaction Monitoring) – измерение нескольких заранее определённых реакций (в случае липидомики – молекулярных видов липидов), и ненаправленные (широкомасштабные) липидомные подходы, например, «shortgun» и SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment-ion spectra – измерение спектров всех теоретических ионов-фрагментов при использовании последовательных окон пропускания).

Особенностью SWATH-MS является разбиение всего диапазона масс на узкие интервалы (окна). После измерения общего масс-спектра всех компонент анализируемой липидной смеси не происходит отбор единичных родительских ионов для MS/MS фрагментации, вместо этого ионы-прекурсоры пропускаются в коллизионную ячейку большими окнами (в данной работе ширина окна составила 14 Da). После проведения эксперимента с помощью специальных программ проводится соотнесение между родительскими и дочерними ионами. Преимущества SWATH заключаются в получении высококачественных количественных данных, охватывающих множество соединений в широком динамическом диапазоне, воспроизводимости, высокой скорости сбора данных и простоте создания метода.

Целью данной работы было оценить возможность применения метода SWATH масс-спектрометрии для изучения липидных профилей базидиальных грибов, богатых полиненасыщенными жирными кислотами.

Объектом исследования был выбран штамм базидиального гриба *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. (LE-BIN) 1483 из коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Штамм выращивали на сусло-агаре в виде поверхностной культуры при 25 °С в темноте в течение 7 суток. Колонию гриба *F. velutipes* разделили на 3 зоны: периферическую (около 1 см от края), для которой характерен полярный рост и неветвящиеся гифы, среднюю (около 1.5 см шириной) с пе-

реплетенными гифами и центральную (около 2 см в диаметре), где мицелий более дифференцированный и наблюдаются сферические агрегации гиф. Мицелий соскабливали для дальнейшей экстракции липидов.

Экстракцию липидов проводили изопропанолом и изопропанолом-хлороформом (1:1) согласно Nickols et al. (1969), после чего выделяли из липидного экстракта отдельные классы фосфолипидов с помощью двумерной ТСХ по Bening et al. (1995). С помощью LC-MS/MS анализа методом SWATH проанализировали гетерогенное распределение молекулярных видов фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) в разных частях колонии *F. velutipes*. LC-MS/MS анализ проводили на Q-TOF масс-спектрометре LC-MS 9030 (Schimadzu, Япония). Обработку данных проводили в программе MS-DIAL (RIKEN, version 4.60) (Tsugawa et al., 2020).

Анализ данных SWATH позволил определить 29 молекулярных видов ФХ, содержащих жирные кислоты C14, C16, C18, C20 и C22 ряда, в меньшем количестве нечётные C15 и C17 кислотами – насыщенными или с 1–3 двойными связями. Профиль ФЭ отличался меньшим разнообразием и включал 14 молекулярных видов. Особенностью профилей ФХ являлось наличие одного доминирующего молекулярного вида – 18:2/18:2 ФХ, составляющего 50–60% от суммы всех молекулярных видов. В профилях ФЭ основные молекулярные виды были представлены 18:2/18:2 ФЭ, 18:2/18:3 ФЭ, 16:0/18:2 ФЭ, 16:1/18:2 ФЭ и 18:1/18:2 ФЭ. Обнаружено, что в краевой зоне грибной колонии накапливались 18:2/18:3 ФХ, 18:3/18:3 ФХ, 18:2/18:3 ФЭ и 18:3/18:3 ФЭ.

Чтобы определить, по какому пути синтезируются ФХ и ФЭ у *F. velutipes* и отличается ли биосинтез молекулярных видов ФХ в разных зонах колонии, был поставлен эксперимент с мечеными дейтерием предшественниками ФХ и ФЭ. Мицелий *F. velutipes* соскребли с поверхности агара и проикубировали в растворе с мечеными дейтерием предшественниками фосфолипидов – D4-этаноламином и D9-холином в течение 12 часов, после чего проэкстрагировали липиды стандартным способом. Обработка данных SWATH-MS продемонстрировала надёжную идентификацию большинства D4- и D9-изотопов фосфолипидов при окне изоляции в 14 Da.

Полученные данные свидетельствуют о включении меченого холина и отсутствии включения меченого этаноламина в ФХ, что позволяет сделать вывод о том, что биосинтез ФХ происходит преимущественно по пути Кеннеди, а не по пути метилирования.

Таким образом, метод SWATH-MS достаточно надёжно определяет существующее разнообразие молекулярных видов в выделенных классах фосфолипидов базидиальных грибов. Полное сканирование продуктов фрагментации в MS² обеспечивает гибкость методов анализа полученных данных, например, выбор аддукта [M+H]⁺ или [M+Na]⁺ можно сделать после получения данных. Это снижает потребность в повторном сборе данных из-за заранее неучтённых соединений или аддуктов и повышает гибкость рабочего процесса обработки данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-24-01152).

Литература

1. Benning C., Huang Z.H., Gage D.A. 1995. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. Arch. Biochem. Biophys. 317, 103–111.
2. Tsugawa H., Ikeda K., Takahashi M., Satoh A., Mori Y., Uchino H., Okahashi N., Yamada Y., Tada I., Bonini P., Higashi Y., Okazaki Y., Zhou Z., Zhu Z.-J., Koelmel J., Cajka T., Fiehn O., Saito K., Arita M., Arita M. General, and lipidomics: A lipidome atlas in MS-DIAL 4. Nature Biotechnology, 38, 1159–1163, 2020
3. Nichols B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography. Biochim. Biophys. Acta 1963, 70, 417–425.

Разработка водорастворимых форм антиоксиданта астаксантина и его эфиров, выделенных из микроводоросли *Haematococcus pluvialis*

Марченкова Н.С.¹, Дудник А.Г.¹, Куликов Е.А.², Куликова И.С.²,
Лукашевич С.В.², Селищева А.А.²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
www.kulikov.e.a.93@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38347

Астаксантин (АСТ) считается одним из сильнейших антиоксидантов среди каротиноидов. Основным источником АСТ в настоящее время является микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), где АСТ на 98% накапливается в виде моно- (МАСТ) или диэфиров (ДАСТ) – гидрофобных молекулах, нерастворимых в воде (рис. 1). Известно, что эфиры АСТ *in vitro* обладают более высокой антиоксидантной активностью, по сравнению с незамещённой формой [1]. Кроме того АСТ и его эфиры обладают широким спектром биологической активности: предотвращение окислительного стресса, профилактика сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, развития катаракты, обладают противовоспалительным действием и др. [2, 3]. Однако использование таких перспективных природных веществ в фармацевтических препаратах в настоящее время ограничено из-за их низкой биодоступности, плохой растворимости в воде (особенно МАСТ и ДАСТ), нестабильности (при нагревании, свете и т.д.) [4].

Целью данной работы является выделение и очистка эфиров из микроводоросли *H. pluvialis*, идентификация состава, а также получение стабильных водорастворимых наносистем на их основе.

В качестве источника астаксантина и его эфиров был использован коммерческий препарат «Astaxanthin esters from *H. pluvialis*» (Sigma Aldrich), представляющий собой экстракт каротиноидной фракции из микроводоросли *H. pluvialis*. С использованием методов колоночной хроматографии, тонкослойной хроматографии, спектрофотометрического анализа, ВЭЖХ и масс-спектрометрии были выделены и охарактеризованы составы ДАСТ и МАСТ астаксантина.

Основными жирными кислотами, входящими в состав эфиров были: пальмитиновая C_{16:0} (11%), олеиновая C_{18:1} (33%), линолевая, C_{18:2} (28%) и линоленовая C_{18:3} (15%) (рис. 2). Проценты указаны для МАСТ, поскольку для ДАСТ количественное определение невозможно из-за большого количества комбинаций различных жирных кислот на противоположных краях молекулы.

В качестве водорастворимой формы АСТ и его эфиров была выбрана липидная наносистема из фосфатидилхолина (S75, Lipoid – 2 мг/мл), полученная методом диспергирования (гидратирования) липидной плёнки. Суть метода заключалась в следующем: S75 вместе с АСТ или его эфирами упаривают до липидной плёнки и диспергируют в горячей воде mQ 65–70 °С. Образовавшийся водный раствор обрабатывается в ультразвуковой ванне (УЗ-ванна) в течение 15 минут.

В рамках нашего исследования изучалась стабильность липидных систем с концентрацией S75 в диапазоне от 1 до 4 мг/мл, и концентрацией АСТ или его эфиров от 0,01 до 0,5 мг/мл. Наиболее стабиль-

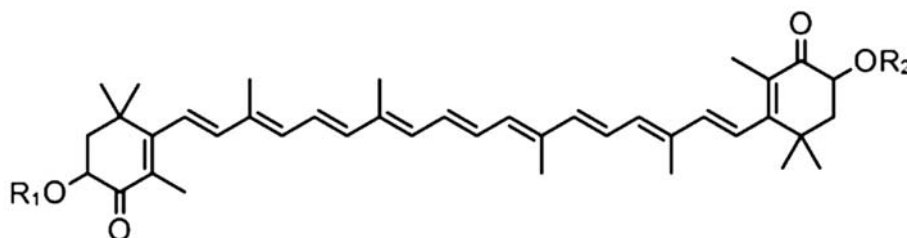
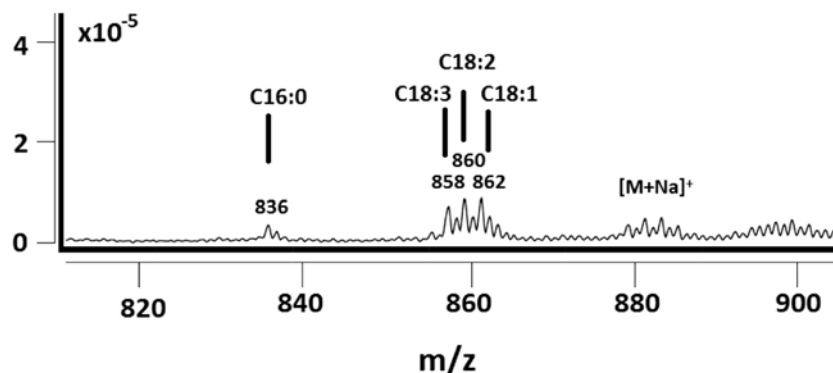


Рис. 1. Химическая структура астаксантина (R₁, R₂ – H), моноэфиров астаксантина (R₁ – H, R₂ – остаток жирной кислоты), диэфиров астаксантина (R₁, R₂ – остаток жирной кислоты)

Рис. 2. Масс-спектрометрия фракции МАСТ, выделенных из экстракта *H. pluvialis*, в режиме прямого ввода



ными оказались системы с концентрацией S75 не более 2 мг/мл, АСТ не более 0,05 мг/мл, а эфиров не более 0,25 мг/мл. Такие растворы сохраняли первоначальные концентрации и размер не менее 1 недели. Средний размер липидных частиц составил от 70 до 300 нм в зависимости от концентрации, а дзета-потенциал от -10 до -40 мВ.

Таким образом, в ходе данной работы разработаны устойчивые водорастворимые наносистемы астаксантина и его эфиров. Дальнейшая работа будет сконцентрирована на оптимизации состава для улучшения стабильности и повышения концентрации АСТ и его эфиров, что позволит расширить их области применения в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

Работа выполнена при поддержке тематического плана 1.8. «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах» НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Böhm F., Edge R., Truscott G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health // Mol. Nutr. Food Res. 2012. Vol. 56, № 2. P. 205–216.
2. Ambati R.R. et al. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – A review // Mar. Drugs. 2014. Vol. 12, № 1. P. 128–152.
3. Che H. et al. Effects of Astaxanthin and Docosahexaenoic-Acid-Acylated Astaxanthin on Alzheimer’s Disease in APP/PS1 Double-Transgenic Mice // J. Agric. Food Chem. 2018. Vol. 66, № 19. P. 4948–4957.
4. Weesepeel Y. et al. Analysis of palmitoyl apo-astaxanthinols, apo-astaxanthinones, and their epoxides by UHPLC-PDA-ESI-MS // J. Agric. Food Chem. 2014. Vol. 62, № 42. P. 10254–10263.

Изучение молекулярных особенностей бактериальных алкангидроксилаз

Медведева А.Д., Богатыренко Е.А., Ким А.В.

Дальневосточный федеральный университет,
medvedeva.ad@dvfu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38348

Разливы нефтепродуктов, промышленные отходы и стоки, активное судоходство являются основными факторами загрязнения морской среды. Одним из наиболее эффективных методов ликвидации нефтяных загрязнений морей является биоремедиация, которая представляет собой комплекс методов очистки биотопов за счет способности организмов, в том числе и микроорганизмов, разрушать различные по химической структуре углеводороды [1]. Бактерии могут окислять широкий спектр углеводородов и продуктов их трансформации, но, несмотря на это в научной литературе нет единого описания молекулярных механизмов деструкции алифатических неразветвленных углеводородов, что в свою очередь

влияет на общее понимание процессов деструкции алканов. В связи с этой целью данной работы: провести анализ литературных данных по изучению молекулярных основ функционирования алкангидроксилаз у бактерий.

Алканы как с короткой, так и с длинной цепью являются распространенными загрязняющими веществами: первые в качестве растворителей воздействуют на клеточные мембраны и другие липидные компоненты клеток, вторые – способствуют образованию нефтяных пленок и пятен, которые могут ограничивать обмен питательных веществ и кислорода внутри водных экосистем [2]. Алкангидроксилазы являются ключевыми ферментами, обнаруживаемыми в бактериальных метаболических путях деградации алканов и ряда других алифатических углеводородов. Обычно алкангидроксилазы представляют собой трехкомпонентные комплексы, состоящие из связанной с мембраной алканмонооксигеназы и двух растворимых белков – рубредоксина и рубредоксинредуктазы [3].

Связанные с интегральной мембраной алканмонооксигеназы (*AlkB*) наиболее часто встречающийся тип алкангидроксилаз, которые хорошо распространены как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий [4]. Ген *alkB* выявлен у родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Amycolatopsis*; ген *alkB1* – у представителей рода *Pseudomonas*, *Rhodococcus*; ген *alkB2* – у родов *Alcanivorax*. Также детально изучены родственные алкангидроксилазы *AlkM*, встречающиеся, главным образом, у бактерий рода *Acinetobacter* [5].

Предполагается, что кластеры генов *alkBFGHJKL* и *alkST*, кодирующие белки, которые участвуют в превращении n-алканов, расположены на плазмиде OCT [6]. Оперон *alkBFGHJKL* кодирует алкангидроксилазу (*AlkB*), два рубредоксина (*AlkF* и *AlkG*), алкоголь- и альдегиддегидрогеназу (*AlkJ* и *AlkH* соответственно), ацил-КоА-синтазу (*AlkK*) и белок внешней мембраны неизвестной функции (*AlkL*) [7]. Локус *alkST* кодирует третий компонент системы алкангидроксилазы, рубредоксинредуктазу (*AlkT*), и *AlkS*, который позитивно регулирует экспрессию оперона *alkBFGHJKL* [7]. Кроме того, этот сегмент ДНК кодирует метил-акцепторный белок-преобразователь (*AlkN*), который может участвовать в хемотаксисе с алканами [6].

Экспрессия генов *alkB1* и *alkB2* индуцируется алканами или их метаболитами [8]. Было показано, что штаммы, способные к деструкции алканов, могут содержать несколько алкангидроксилаз, которые обладают различной субстратной специфичностью и по-разному индуцируются в зависимости от алкана, присутствующего в питательной среде. В других случаях, как, например, у *P. aeruginosa*, дифференциальная экспрессия зависит от фазы роста клетки, а не от природы субстрата [9].

В данной работе мы попытались на основе литературных данных дать характеристику молекулярным механизмам окисления алканов. Однако в настоящий момент все же остаются вопросы, связанные с пониманием молекулярной связи оперонов синтеза алкангидроксилаз и биосурфактантов, регуляторных областей, а также вопросы гомологии алкангидроксилаз у представителей различных таксонов.

Литература

1. Wackett L.P. Biodegradation of fuel components / L.P. Wackett // Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 10, № 5. – P. 1380–1381.
2. Sikkema J. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // J. Sikkema, J.A.M. de Bont, B. Poolman. // Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 59. – P. 201–222.
3. Whyte L.G. Article Navigation Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils / L.G. Whyte, A. Schultz, J.B. van Beilen, A.P. Luz, V. Pellizari, D. Labbe, C.W. Greer // FEMS Microbiology Ecology. – 2002. – Vol. 41, № 2. – P. 141–150.
4. Nie Y. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments / Nie Y., C.Q. Chi, J.L. Liang, H. Fang, S.L. Lu, Y.O. Tang, G.L. Lai, X.L. Wu. // Scientific reports. – 2014. – Vol. 4, № 4968. – P. 1–11.
5. Kohno T. Design of PCR Primers and Gene Probes for General Detection of Alkane-Degrading Bacteria / T. Kohno, Y. Sugimoto, K. Sei, K. Mori // Microbes and Environments. – 2002. – Vol. 17, № 3. – P. 114–121.
6. van Beilen J.B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes / J.B. van Beilen, S. Panke, S. Lucchini, A.G. Franchini, M. Rothlisberger, B. Witholt. // Microbiology. – 2001. – Vol. 147, № 6. – P. 1621–1630.
7. van Beilen J.B. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans* / J.B. van Beilen, G. Eggink, H. Enequist, R. Bos, B. Witholt. // Molecular Microbiology. – 1992. – Vol. 6, № 21. – P. 3121–3136.

8. Merckx M. Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins / M. Merckx, D.A. Kopp, M.H. Sazinsky, J.L. Blazyk, J. Muller, S.J. Lippard // *Angewandte Chemie (International ed. In English)*. – 2001. – Vol. 40, № 15. – P. 2782–2807.
9. van Beilen J.B. Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* / J.B. van Beilen, M.M. Marin, T.H.M. Smits, M. Röthlisberger, A.G. Franchini, B. Witholt, F. Rojo // *Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 6, № 3. – P. 264–273.

Метаболические особенности использования маннита и метанола факультативным метилотрофом *Methylobrevia pamukkalensis* PK2

Мельников О.И., Розова О.Н.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
oleg96mel@gmail.com, rozovaolga1@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38349

Факультативный метилотроф *Methylobrevia pamukkalensis* PK2 является представителем нового семейства *Pleomorphomonadaceae* класса *Alphaproteobacteria*. Как и все известные на сегодняшний день метилотрофы данного класса, *M. pamukkalensis* использует сериновый путь C1 ассимиляции, первичными продуктами которого являются C2- и C3-соединения. Помимо метанола, *M. pamukkalensis* способен расти на C6 сахарном спирте манните и ряде простых сахаров. D-маннит является наиболее распространенным полиолом в природе, а некоторые паразитические грибы синтезируют маннит на начальном этапе колонизации растений. Анализ генома *Mb. pamukkalensis* PK2 выявил небольшой кластер, включающий в себя гены транспортной системы маннита и маннит-2-дегидрогеназы (МТДГ), предположительно обеспечивающий ферментативную основу окисления маннита до фруктозы. Затем фруктоза фосфорилируется до фруктозо-6-фосфата фруктокиназой. Дальнейший же распад C6 фосфосахаров происходит по пути Энтнера-Дудорова (Pogoshina et al., 2015).

В ходе работы был получен гомогенный белковый препарат рекомбинантной МТДГ, в отличие от других охарактеризованных ферментов, необратимо катализировавшей окисление маннита до фруктозы с восстановлением НАД⁺ до НАДН. Фермент является мономером с молекулярной массой 53 кДа. Максимальная активность МТДГ составила 136 Е/мг белка. Фермент работал в широком диапазоне рН от 8 до 11 с оптимумом рН 10,5. Температурный оптимум составил 50 °С. МТДГ – термостабильна, выдерживает нагрев до 50 °С без потери активности в течение 60 минут. При оптимальном рН и 30 °С значение К_м для маннита составило (0,24±0,027) мМ, для НАД⁺ – (0,035±0,002) мМ. Фосфоенолпируват в концентрации 1 мМ выступает в качестве умеренного ингибитора МТДГ, снижая её активность на 30%. С другой стороны, сукцинат, гидроксипируват, глюкоза-1,6-бисфосфат, АДФ, фумарат, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, глюкоза-6-фосфат и АМФ увеличивали активность фермента на 30–50%.

Выращивание *Mb. pamukkalensis* PK2 одновременно на метаноле и манните показало, что пути утилизации обоих субстратов функционируют параллельно и с относительно схожей эффективностью, о чем свидетельствуют данные скорости и объема использования субстратов относительно показателей роста культуры. Таким образом, можно говорить о полной независимости путей утилизации маннита и метанола. Однако, активность МТДГ отсутствовала в бесклеточных экстрактах клеток, выращенных на метаноле, что указывает на индуцибельность пути окисления маннита.

С помощью гена контрелекции *sacB* был получен безмаркерный делеционный штамм по гену *mtlK*, кодирующему маннит-2-дегидрогеназу. Несмотря на отсутствие ключевого фермента окисления маннита, культура продолжала расти на данном субстрате. Поскольку *Mb. pamukkalensis* PK2 способен расти на простых сахарах (глюкозе, фруктозе, маннозе, ксилозе, арабинозе), вероятно, ферменты, ответственные за окисление данных субстратов, имеют неспецифическую активность и с маннитом. Таким

образом, можно сделать вывод о наличии альтернативного пути, этапа или фермента, осуществляющего прямое или косвенное окисление маннита. Безмаркерный мутантный штамм *Mb. pamukkalensis* с полностью deletированной системой транспорта маннита, включающей в себя предположительно 4 гена, был не способен расти на манните. Следовательно, маннит проникает в клетки *Mb. pamukkalensis* за счет строго специфичной транспортной системы ABC типа.

Влияние кинетики микросостояний биохимической системы на её энтропию

Минкевич И.Г.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
minkevich@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38350

Метаболизм живых клеток представляет собой сложную систему, подчиняющуюся физико-химическим закономерностям, в том числе законам термодинамики. Последние образуют жёсткие рамки, в которые укладывается всё биологическое разнообразие, от метаболических путей и клеточных структур до экосферы Земли. Эти законы определяют материально-энергетический баланс метаболизма, направление метаболических потоков и в значительной степени соотношение между разветвляющимися потоками, что, в свою очередь, определяет границы выходов биомассы клеток и целевых продуктов из сырья – источника вещества и энергии.

Термодинамические величины, такие как свободная энергия и входящая в одно из её слагаемых энтропия, широко используются в биохимии. Однако их применение к неравновесным процессам, таким как многие биохимические реакции, связано с фундаментальными проблемами, которые фактически скрыты и, по существу, «обходятся стороной» в практике применения термодинамических величин. Кроме того, само понятие энтропии, несмотря на то, что ей посвящен огромный массив публикаций самой различной степени сложности анализа и изложения, для многих исследователей остаётся величиной, покрытой флёром таинственности.

Данная работа посвящена проблемам, связанным с энтропией, которые сформулированы ниже. Мы исходим из общего положения термодинамики, которое говорит о том, что одно и то же макроскопическое состояние большой системы соответствует большому множеству её микроскопических состояний. Например, координаты молекул, их скорости и направления движения могут быть самыми разнообразными при одном и том же значении температуры и давления газа в некоторой ёмкости. Последние две величины в данном примере характеризуют макроскопическое состояние газа.

Проблема 1. В статистической термодинамике считается, что система, находящаяся в заданном макроскопическом состоянии, переходит из одного микроскопического состояния в другое так, что в каждом микросостоянии она проводит одно и то же время. Это – допущение, которое не доказано ни теоретически, ни экспериментально. В связи с этим возникает вопрос: как влияет возможная неравномерность пребывания в разных микросостояниях на величину энтропии. Это важно, например, для применения значения свободной энергии образования какого-то метаболита, если это значение получено как результат какого-то одного эксперимента, к другим реакциям, в которых этот метаболит участвует.

Проблема 2. Как влияет микроскопическая кинетика на скорость установления равновесного макроскопического состояния. От этого зависит корректность применения равновесных табличных значений термодинамических величин к метаболическим процессам, в которых полного термодинамического равновесия нет.

В данной работе эти проблемы рассмотрены для систем, микроскопические состояния которых образуют дискретное множество. Это имеет место для объектов, в поведении которых определяется кван-

товомеханическими закономерностями (например, ферментов). Разработана модель, описывающая случайные переходы между микросостояниями. Рассмотрено микроскопическое поведение изолированной системы, а именно, распределение вероятностей её пребывания в разных микросостояниях. Рассмотрение изолированной системы – первая задача статистической термодинамики. Получены следующие результаты.

1. При неравномерном распределении вероятностей пребывания макросистемы в различных микросостояниях энтропия макросистемы снижается на малозаметную величину. Например, если рассматривать систему магнитных моментов молекул во внешнем магнитном поле при числе молекул, равном 1 моль, то максимальная безразмерная энтропия этой системы при равновероятном распределении по микросостояниям имеет порядок величины 10^{23} (для справки: размерное значение энтропии получается из безразмерного умножением на постоянную Больцмана $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К). Отклонения же безразмерной энтропии от её максимального значения при различии вероятностей разных микросостояний примерно в 10 раз – порядка $1 \div 10$. Лишь когда одно или несколько микросостояний становятся доминирующими, снижение энтропии становится заметным. Отсюда следует, что в практически встречающихся ситуациях можно считать распределение макросистемы по микросостояниям равновероятным, а использование значений термодинамических величин, полученных в одном эксперименте, в других условиях – правомерным.

2. Скорость установления равновесного микросостояния, напротив, существенно зависит от картины случайных переходов между микросостояниями. Если из каждого микросостояния возможны переходы в любое другое, то скорость установления равновесного распределения вероятностей пребывания макросистемы во всех микросостояниях и, соответственно, скорость достижения энтропией её максимума весьма велика. Если же существует избранное микросостояние, в которое система переходит из любого начального микросостояния и только потом может перейти в любое следующее микросостояние, то скорость установления равновесия и максимума энтропии меньше, чем в предыдущей ситуации, в число раз, равное общему числу микросостояний, то есть на много порядков меньше. В любом случае, причиной «расползания» картины пребывания системы в разных микросостояниях является вид кинетической зависимости случайных переходов между микросостояниями, а наличие или отсутствие запрещённых переходов на факт такого «расползания» не влияет.

3. Фактором, наиболее сильно влияющим на величину энтропии микросостояния системы, является общее число микросостояний.

Разработанная модель, описывающая случайные переходы между микросостояниями, и полученные на её основе результаты способствуют общему пониманию энтропии как макроскопического показателя кинетики большой системы.

Физиологические аспекты деградации углеводов штаммом *Pseudomonas veronii* 7p-81

Мулаева С.А.¹, Стрелецкий Р.А.², Делеган Я.А.¹, Сазонова О.И.¹, Иванова А.А.¹, Ветрова А.А.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
sv.bolsharina@gmail.com

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38351

Сырая нефть является основным источником топлива и в целом крупнейшим источником первичной энергии. Нефть представляет собой сложную смесь углеводородов и других органических соединений, включая некоторые металлоорганические компоненты. Она содержит сотни или тысячи алифатических, разветвленных и ароматических углеводородов. Несмотря на то, что нефть связана почти со всеми ас-

пектами нашей жизни сегодня, ее разливы могут приводить к катастрофическим последствиям: от гибели отдельных растений и животных до разрушения целых экосистем и т.д. Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки признано одной из важнейших серьезных актуальных проблем современности. Биodeградация углеводородов естественными популяциями микроорганизмов представляет собой одну из основных технологий удаления нефти и других углеводородных загрязнителей из окружающей среды. Штамм *Pseudomonas veronii* 7p-81 был выделен из образца грунта, отобранного в районе нефтяного месторождения Нефтеюганского района ХМАО. Выделенный микроорганизм способен к деградации как *n*-алканов (только в диапазоне C₈–C₁₂), так и полициклических ароматических углеводородов (нафталин, фенантрен). Штаммы бактерий с широким метаболическим профилем могут обладать преимуществом в условиях комплексного загрязнения по сравнению с микроорганизмами способными к окислению только одного класса углеводородов. Кроме того, «мультидеструкторы» данного типа можно использовать в качестве модельных объектов для изучения деградации таких сложных субстратов как нефть. Целью данного исследования являлось изучение физиолого-биохимических аспектов деградации углеводородов нефти штаммом *Pseudomonas veronii* 7p-81.

P. veronii 7p-81 является деструктором углеводородов разных классов, поэтому на первом этапе работы была проведена оценка деградирующего потенциала штамма в отношении различных фракций нефти (табл. 1).

Таблица 1

Остаточное содержание углеводородов в исследуемых системах и степень деградации разных фракций нефти штаммом 7p-81.

	Контрольная система без микроорганизмов	Система со штаммом <i>P. veronii</i> 7p-81	Степень деградации, %
<i>n</i> -алканы	511±77	408±64	20,16
Среднекипящая фракция	3101±465	2498±375	19,45
Высококипящая фракция	2365±355	1909±286	19,28
Общее содержание нефтепродуктов	5977±820	4815±661	19,44

Большая доля окисления *n*-алканов штаммом *P. veronii* 7p-81 приходилась на алканы с длиной цепи C₁₀–C₂₄. В культуральной среде не было обнаружено накопления короткоцепочечных алканов (менее C₈), что свидетельствует об окислении алифатической фракции до более простых соединений. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), входящие в состав среднекипящей фракции нефти, также активно подвергались деградации штаммом *P. veronii* 7p-81. В работе было выявлено, что все основные компоненты нефти разрушались примерно с одинаковой интенсивностью (около 20% за 7 дней).

На следующем этапе работы был проведен эксперимент по оценке деградации углеводородов разных классов штаммом *P. veronii* 7p-81 в жидкой минеральной среде (бисубстратная система), содержащей одновременно *n*-алкан (декан) и ПАУ (нафталин). В бисубстратной системе в первые 20 часов культивирования наблюдалась деградация только алифатического углеводорода. Процесс деградации ПАУ начинался позднее (через 21 час культивирования), что, по-видимому, связано со снижением концентрации алифатического соединения в среде и его доступности клеткам бактерии. Несмотря на то, что штамм *P. veronii* 7p-81 в бисубстратной системе также утилизировал ПАУ (нафталин), удельная активность ключевых ферментов деградации нафталина была низкой, по сравнению со значениями ферментативной активности в среде только с нафталином (данные не представлены). Вероятно, высокие концентрации декана влияют на активность ферментов деградации нафталина (в частности, снижается показатель активности салицилат гидроксилазы в период с 30 по 35 часов роста – данные не представлены).

Следует отметить, что через 52 часа роста штамма *P. veronii* 7p-81 в бисубстратной системе (рис. 1А) наблюдается снижение численности клеток. Это явление сопровождается процессом «торможения» деградации обоих углеводородов (рис. 1Б) и в дальнейшем степень деградации *n*-алкана и ПАУ практически не изменяется.

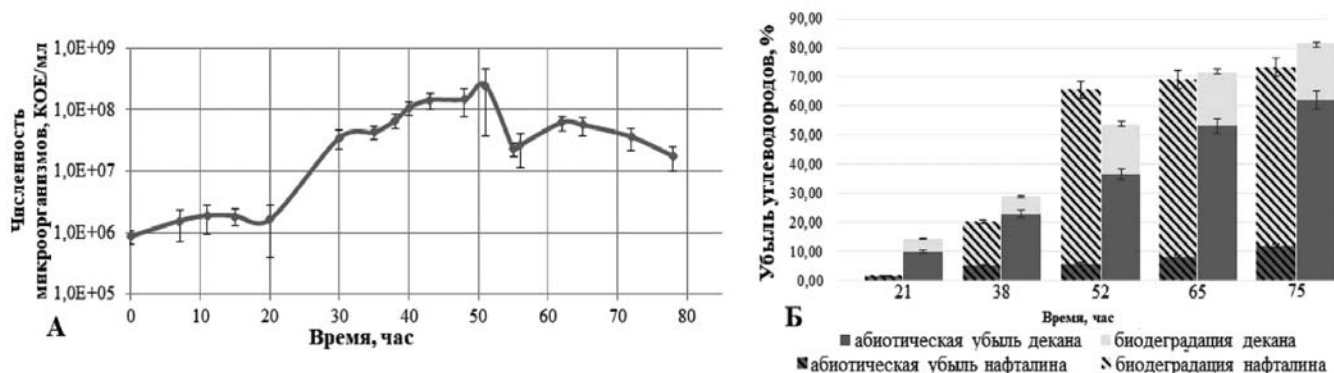


Рис. 1. Физиологические параметры роста штамма *P. veronii* 7p-81 в жидкой минеральной среде при одновременном присутствии декана и нафталина.

А – кривая роста штамма; Б – накопительные показатели убыли нафталина (без штриховки) и декана (со штриховкой) (абиотическая убыль (нижняя часть столбца) и биодеградация (верхняя часть столбца))

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что при использовании микроорганизмов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, в том числе в составе консорциумов, необходимо учитывать не только их способность к деградации индивидуальных или смешанных субстратов, но и влияние углеводов разных классов на активности ферментов биодеградации.

Эндолизин бактериофага 3 *Aeromonas* – кальцийзависимая пептидогликангидролаза

Мусаева А.А.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Молочков Н.В.³, Прохоров Д.А.³, Микулинская Г.В.^{1,2}

¹ Филиал Института биоорганической химии РАН, Пущино

² Пущинский государственный естественно-научный институт

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
musaeva_ayajan@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38352

Бактериофаги *Caudovirales* на заключительной стадии литического пути развития для выхода зрелого потомства индуцируют синтез группы белков, осуществляющих лизис клеточной стенки бактерии-хозяина изнутри. Ферментативный компонент системы лизиса представлен эндолизинами: эти ферменты специфически гидролизуют пептидогликан. Эндолизины группы пептидаз способны гидролизовать связи между неканоническими или D-аминокислотами, входящими в состав пептидогликана; это отличает их от обычных пептидаз и обеспечивает научно-практический интерес как к потенциальным антибактериальным средствам или эффективному биотехнологическому инструментарию.

При анализе генома бактериофага 3 (*Myoviridae*), инфицирующего гетеротрофные грамотрицательные палочковидные бактерии рода *Aeromonas*, была обнаружена белковая последовательность APU00465.1 длиной 135 аминокислот, проявляющая гомологию с цинк-зависимыми эндолизинами группы L-аланил-D-глутаматпептидаз. Интересно, что аминокислотные остатки 113-123 гипотетического белка образовывали неканоническую EF-подобную кальций-связывающую петлю, до сих пор обнаруженную только у эндолизина бактериофага T5. Целью настоящей работы было получить рекомбинантный белок и охарактеризовать его антибактериальную активность и биохимические свойства.

Путем синтеза гена на основе вектора pET28a была получена рекомбинантная плаزمид, несущая искусственный ген, кодирующий последовательность природного белка. Растворимый белок продуциро-

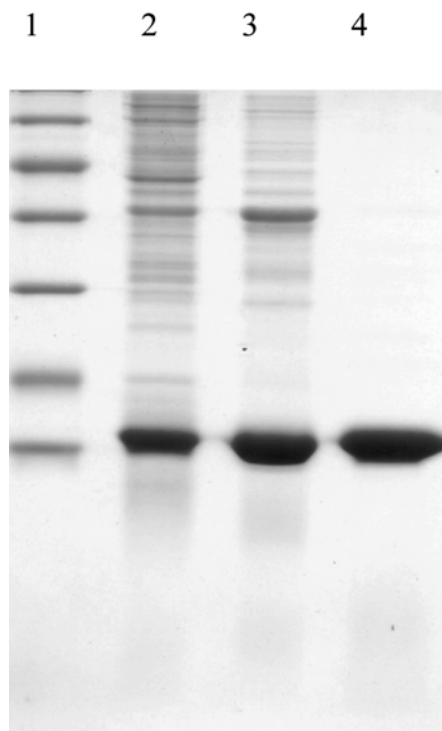


Рис. 1. Результаты SDS-электрофореза в 15% ПААГ фракций белка после очистки. Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы (116, 66, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 кДа), 2 – грубый экстракт; 2 – фракция после хроматографии на Toyopearl 650M; 3 – объединенный элюат после хроматографии на фосфоцеллюлозе

межмолекулярных взаимодействий в результате постепенной агрегации молекул. ЯМР спектры исследовали для фермента в трех состояниях: безионной апоформы, цинксодержащей формы и двуионной Zn^{2+} - Ca^{2+} -формы. Наличие сигналов в высокопольной (0.5–0.0 ppm) части 1H ЯМР спектра апоформы фермента указывает на существование гидрофобного ядра, боковые цепи алифатических аминокислотных остатков которого фиксированы относительно радикалов ароматических остатков. Связывание ионов Zn^{2+} сопровождается увеличением дисперсии сигналов в этой части спектра, что свидетельствует об увеличении плотности упаковки кора при связывании Zn^{2+} . Связывание ионов Ca^{2+} цинксодержащей формой фермента приводит к дальнейшему увеличению дисперсии высокопольных резонансов, а также к возникновению низкопольных резонансов (10.72, 11.56, 12.71 и 14.74 ppm) от δ - и ϵ -NH-протонов имидазольных колец остатков гистидинов активного центра. Таким образом, двуионная форма фермента наиболее структурирована.

Исследование спектра бактериолитического действия нового эндолизина показало, что фермент при применении *in vivo* эффективно лизирует пермеабилитизированные хлороформом клетки грамотрицательных энтеробактерий *Escherichia coli* и *Pectobacterium carotovora*, а также живые клетки бактерий рода *Bacillus*, пептидогликан которых относится к тому же типу (A1 γ), что и пептидогликан грамотрицательных микроорганизмов (к последним принадлежит и хозяин фага 3 *Aeromonas* sp.).

Таким образом, белковая последовательность APU00465.1 бактериофага 3 *Aeromonas* представляет собой функциональный эндолизин, чья активация ионами кальция свидетельствует о роли ионов периплазмы в реализации процесса лизиса белками бактериофагов, инцидирующих грамотрицательных хозяев.

вали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) путем индукции 0.05 mM IPTG в течение 15 часов при 20 °C. Электрофоретически гомогенный препарат получали, последовательно хроматографируя осветленный экстракт на Toyopearl DEAE 650M, а затем на фосфоцеллюлозе (рис. 1).

Выход чистого фермента по активности составил 13.7%, степень очистки – 4.9. Максимальная удельная литическая активность чистого препарата составила 4482 ± 299 Е/мг.

Концентрация Трис-НСl буфера (рН = 8.0) для максимальной активности фермента составила 25–50 mM. Оптимум рН исследовали как в Трис-НСl буфере, так и в глицин-NaOH буфере, и определили его в области значений рН от 8.5 до 9.5. Ионы цинка полностью ингибируют фермент (это характерная черта цинк-зависимых пептидаз). Полная потеря активности фермента в калий-фосфатном буфере, вероятно, вызвана нерастворимостью фосфатов каталитического цинка. В противоположность этому, неионный детергент Тритон X100 увеличивает активность эндолизина, возможно, за счет влияния на субстрат. Предположение, что фермент является Ca^{2+} -зависимым, подтвердилось экспериментально: как хелаторы широкого спектра действия (EGTA, EDTA), так и специфичный к кальцию хелатор ВАРТА являются ингибиторами, а активность после ингибирования полностью восстанавливается добавлением ионов Ca^{2+} или Mn^{2+} . Фермент термолабилен – выдерживает нагревание до 50 °C, теряет три четверти активности при повышении температуры до 60 °C и полностью инактивируется при дальнейшем нагреве. Инактивация необратима и сопровождается выпадением осадка. Исследование структуры белка в растворе методом кругового дихроизма показало, что нативный фермент относится к глобулярным белкам $\alpha\beta$ класса и содержит 44.9% α -спиральных и 6% β -складчатых структур; при длительном хранении содержание β -складок в препарате возрастает за счет

Исследование состава и амилолитической активности внеклеточных белков *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*

Мустафина А.Д.¹, Апканиева А.В.¹, Цветков В.О.¹, Ярулина Л.Г.²

¹ Башкирский государственный университет, Уфа,
mustafinaa2001@mail.ru

² Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38353

Исследовали состав и ферментативную активность внеклеточных белков бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*, культивируемых на жидкой питательной среде в течение 10 дней. Бактерии рода *Bacillus* являются стимулирующими рост растений бактериями (PGPB – plant growth promoting bacteria), составляющими основу биопрепаратов для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Бактерии способны воздействовать на рост растений за счет выделения в окружающую среду множества метаболитов, в том числе белковой природы [1]. В данной работе исследовали состав и динамику накопления внеклеточных белков *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, а также молекулярный состав и изменение активности амилолитических ферментов, являющихся одними из ключевых гидролаз, продуцируемых бактериями.

В работе использовали бактерии *B. subtilis*, штамм 26Д, и *B. thuringiensis*, штамм 10, из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. Бактерии выращивали на жидкой питательной среде LB. Через каждые 2 дня производили отбор среды для биохимических исследований. Активность амилолитических ферментов определяли методом гидролиза крахмала, иммобилизованного в полиакриламидном геле. Состав белков культуральной жидкости исследовали методом SDS-электрофореза с предварительным осаждением белков ацетоном. Молекулярный состав амилаз определяли методом зимографии – электрофореза в полиакриламидном геле с иммобилизованным крахмалом.

Для определения необходимого времени культивирования бактерий и наибольшей амилолитической активности измеряли оптическую плотность при 600 нм и ферментативную активность в культуральной жидкости (рис. 1). Были выявлены значительные различия как кривых роста, так и динамики фер-

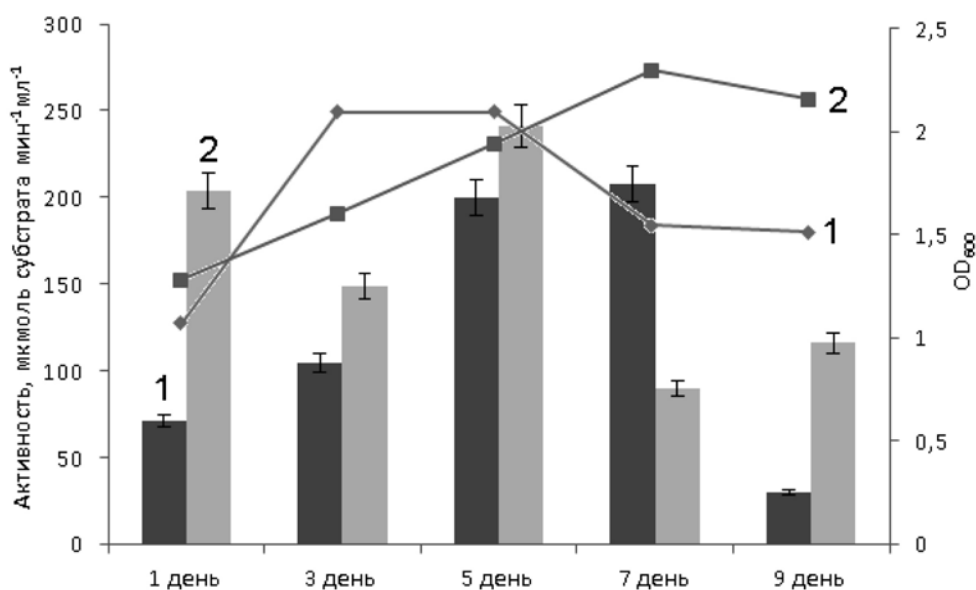


Рис. 1. Амилолитическая активность в культуральной жидкости *B. subtilis* (1) и *B. thuringiensis* (2) в различные дни культивирования и кривая роста бактерий

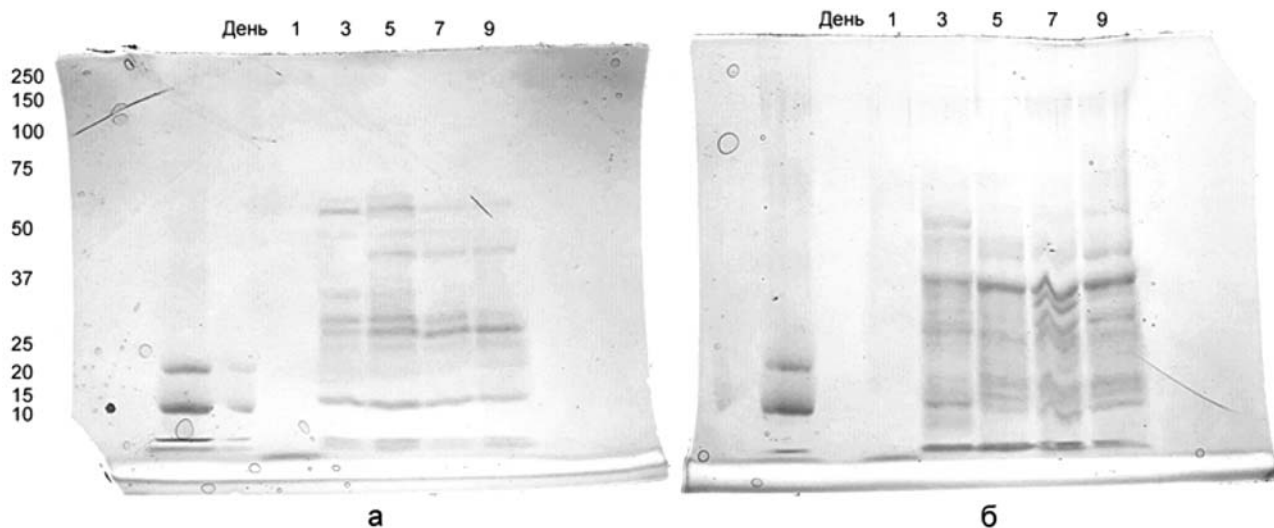


Рис. 2. SDS-электрофорез белков культуральной жидкости *B. subtilis* (а) и *B. thuringiensis* (б)

ментативной активности у разных видов бактерий. В то же время, наибольшая активность ферментов у обоих видов наблюдалась на 5-й день культивирования.

Образцы, обладающие наибольшей активностью, концентрировали методом лиофильного высушивания и анализировали методом зимографии. В культуральной жидкости *B. subtilis* было выявлено присутствие двух форм амилазы с молекулярными массами около 40 и 60–70 кДа. В литературе описана α -амилаза, характерная для бактерий рода *Bacillus*, с молекулярной массой 70 кДа [2]. Кроме того, описана α -амилаза *Bacillus pacificus* с молекулярной массой 40 кДа, отличающаяся рядом физико-химических и функциональных особенностей [3]. В культуральной жидкости *B. thuringiensis* отмечалась активность одной формы амилазы с молекулярной массой 40 кДа.

Методом SDS-электрофореза выявлены различия в молекулярном составе белков культуральной жидкости *B. subtilis* и *B. thuringiensis* (рис. 2). Активное выделение белков в среду наблюдается с 3-го дня культивирования, в дальнейшем количество белков в среде практически не меняется и в целом коррелирует с кривыми роста бактерий. Уменьшение содержания некоторых белков в среде, по-видимому, объясняется процессами распада, связанными с уменьшением числа клеток на поздних стадиях культивирования. Идентификация внеклеточных белков бактерий и выяснение их роли во взаимодействиях с другими организмами должны стать предметом дальнейшего изучения.

Литература

1. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 11. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1007/s00253-009-2092-7
2. de Souza P.M., de Oliveira Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry – A review. Braz J Microbiol. 2010. V. 41. No. 4. P. 850-861. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1590/S1517-83822010000400004
3. Alonazi M., Karray A., Badjah-Hadj-Ahmed A., Ben Bacha A. Alpha Amylase from *Bacillus pacificus* Associated with Brown Algae *Turbinaria ornata*: Cultural Conditions, Purification, and Biochemical Characterization. Processes. 2021. V. 9. No. 16. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.3390/pr9010016.

Развитие моделей трансдукции плазмид псевдо-Т-четными бактериофагами

Никулина А.Н., Никулин Н.А., Зимин А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН –
обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Московская область, Российская Федерация,
firetiger2011@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38354

Изучение моделей трансдукции плазмид представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной молекулярной генетики, в том числе для экологии микробных сообществ и биотехнологии продуцентов промышленно важных белков. Но основным интересом к изучению трансдукции плазмид является участие этого генетического процесса в распространении генов устойчивости к антибиотикам в природе, включая как организмы человека и сельскохозяйственных животных, так и различные природные, в первую очередь водные биотопы. Бактериофаги Т4 не обладает способностью к трансдукции, что связано с наличием 5'-гидроксиметилцитозина в его ДНК. Полученный Вильсоном и соавторами так называемые «цитозиновый мутант» бактериофаги Т4, у которого вместо 5'-гидроксиметилцитозина в геноме содержится цитозин трансдуцирует как плазмидные, так и хромосомные маркеры (1). Трансдукция плазмидных маркеров происходит за счет упаковки в капсид длинного конкатемера со структурой «голова-хвост», состоящего, например, для рBR322 из 39,5 копий генома данной плазмиды (2). В конце 1990-х – начале 2000 годов Тяншиным В.И. и соавторами было показано, что природные псевдо-Т-четные бактериофаги трансдуцируют плазмиды и даже биплазмидные системы (3,4). Изучение этого процесса требует создания новых подходов, в том числе использования нового спектра маркеров для развития моделей для изучения трансдукции в лабораторных и природных условиях.

Использование плазмид с генами устойчивости к антибиотикам разных спектров – один из популярных маркеров, который используется для отслеживания успешного осуществления трансдукции посредством фаговой инфекции. Например, бактериальная культура-реципиент, ранее не имевшая устойчивости к антибиотикам после заражения трансдуцирующими бактериофагами RB43, несущими в своем капсиде несколько десятков копий плазмиды рBR322, приобретает устойчивость к тетрациклину и к ампициллину, что выражается в способности данной культуры расти на питательных средах, содержащих данные антибиотики. Тем самым, приобретение антибиотикорезистентности культурой-реципиентом является первым и одним из основных доказательств успешного проведения процесса трансдукции *in vitro*. Для моделирования природных процессов *in vivo* – например, трансдукции в кишечнике двусторчатых моллюсков, использование плазмид с генами устойчивости к антибиотикам может быть недостаточно в связи с широким распространением антибиотикорезистентных бактерий – они могут уже входить в состав кишечного микробиома выбранного для опыта моллюска. В связи с этим возникает потребность в использовании новых маркеров для изучения трансдукции в природных условиях. Более наглядным и удобным примером для моделирования процесса горизонтальной передачи генов в природных условиях при участии бактериофагов, может стать использование плазмид с генами флуоресцирующих белков, например, плазмиды с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP – рTurboGFP-B.

В данной работе была произведена проверка частоты трансдукции плазмиды рTurboGFP-B бактериофагами RB43, RB49 (3,4). На первом этапе работы была проведена трансформация плазмидной ДНК рTurboGFP-B в штамм *E. coli* – 5К, чувствительный к бактериофагам RB43, RB49. Получение трансдуцирующих частиц RB43 и RB49, содержащих рTurboGFP-B, а также трансдукцию плазмиды рTurboGFP-B в штамм-реципиент 5К, не содержащий данную плазмиду, производили по методике, описанной ранее. Высев трансдуктантов производился на чашки с агаризованной средой LB с добавлением антибиотиков ампициллина, левомецитина в разных концентрациях. Результат трансдукции представлен в табл. 1 и табл. 2.

Результаты трансдукции плазмиды pTurbo бактериофагом RB43

Антибиотик, мкг/мл	Титр фага ср, БОЕ/мл	Титр 5к без плазмиды pTurbo, КОЕ/мл	Кол-во трансдуктантов, КОЕ	Наличие флуоресцирующих колоний, КОЕ	V фага, мкл	V CR204, мкл	V смеси фаг+культура на чп, мкл	Частота трансдукции
ампициллин, 100	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	222	2	750	750	100	$2,9 \cdot 10^{-5}$
левомецитин, 25	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	41	2	200	200	100	$5,5 \cdot 10^{-6}$
ампициллин, 100 и левомецитин 25	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	1	1	200	200	100	$1,3 \cdot 10^{-7}$

Таблица 2

Результаты трансдукции плазмиды pTurbo бактериофагом RB49

Антибиотик, мкг/мл	Титр фага ср, БОЕ/мл	Титр 5к без плазмиды pTurbo, КОЕ/мл	Кол-во трансдуктантов, КОЕ	Наличие флуоресцирующих колоний, КОЕ	V фага, мкл	V CR204, мкл	V смеси фаг+культура на чп, мкл	Частота трансдукции
ампициллин, 100	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	2	2	750	750	100	$1,3 \cdot 10^{-8}$
левомецитин, 25	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	0	0	750	750	100	0
ампициллин, 100 и левомецитин 25	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	2	2	750	750	100	$1,3 \cdot 10^{-8}$

Частота трансдукции для каждого бактериофага соответствует частотам трансдукции данными бактериофагами другим плазмид. Способность к флуоресценции у колоний выявлялась на первые-вторые сутки. Таким образом, использование маркера в виде плазмиды с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP – pTurboGFP-B возможно для моделирования экспериментов с трансдукцией в природных системах.

Благодарим младшего научного сотрудника лаборатории биологии вирусов бактерий ИБФМ РАН Казанцеву Олесю Андреевну за предоставление плазмиды pTurboGFP-B.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669>.

Литература

1. Wilson G.G., Young K.Y., Edlin G.J., Konigsberg W. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature* 280, 80–82 (1979). <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1038/280080a0>
2. Takahashi H., Saito H. Mechanism of pBR322 transduction mediated by cytosine-substituting T4 bacteriophage. *Mol Gen Genet.* 1982;186(4):497-500. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1007/BF00337955. PMID: 6752658.
3. Tanyashin V.I., Zimin A.A., Shlyapnikov M.G., Boronin A.M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages. *Russian Journal of Genetics* 39, 761–772 (2003). <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1023/A:1024748903232>
4. Tanyashin V.I., Zimin A.A. & Boronin A.M. The Cotransduction of pET System Plasmids by Mutants of T4 and RB43 Bacteriophages. *Microbiology* 72, 694–700 (2003). <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1023/B:MICI.0000008372.06477.43>.

Клонирование генов эндоглюканаз из актинобактерии *Streptomyces spiralis* ВКМ Ас-1311

Петракова М.П., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино,
marina-mp2000@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38355

Ферменты эндоглюканазы, а именно ксиланазы и целлюлазы, широко используются в разных отраслях промышленности: пищевой, целлюлозно-бумажной, легкой. При этом они являются сложными для получения, так как при гетерологичной наработке часто агрегируют. Цель данной работы: амплификация генов ксиланазы и целлюлазы (номера аминокислотных последовательностей в базе данных NCBI: WP_189896010 и WP_189902393.1, соответственно) из штамма *Streptomyces spiralis* ВКМ Ас-1311.

Из штамма *Streptomyces spiralis* ВКМ Ас-1311 была выделена геномная ДНК с использованием коммерческого набора QIAamp® DNA Mini Kit согласно инструкции производителя (Qiagen, Нидерланды). Выделенную геномную ДНК хранили при -20°C .

С помощью программы IDT OligoAnalyzer™ Tool были написаны праймеры для амплификации генов ксиланазы и целлюлазы. Праймеры были проверены на отсутствие шпилек и димеризации. Были определены теоретические температуры отжига этих праймеров (S.sp.1F – $54,6^{\circ}\text{C}$; S.sp.1R – $52,8^{\circ}\text{C}$; S.sp.7F – $56,3^{\circ}\text{C}$; S.sp.7R – $59,3^{\circ}\text{C}$)

Была осуществлена ПЦР-амплификация генов ксиланазы и целлюлазы. Электрофорез продуктов ПЦР-амплификации представлен на рис. 1.

Условия ПЦР-амплификации были следующие:

1. Начальная денатурация – 95°C 5 мин;
2. 35 циклов: денатурация – 95°C 30 с; отжиг праймеров: для ксиланазы – 55°C 30 с, для целлюлазы – 51°C 30 с;
3. Элонгация – 72°C 1 мин 40 с; финальная элонгация – 72°C 2 мин.

Электрофорез в агарозном геле показал, что условия для наработки гена целлюлазы оказались не подходящими. Поэтому для постановки ПЦР использовали разные сочетания полимераз и буферов (от разных производителей). Наиболее успешным для наработки гена целлюлазы было сочетание Taq-полимеразы фирмы Диаэм (Россия) и GC-богатого буфера компании Thermo Fisher Scientific (США) (рис. 2).

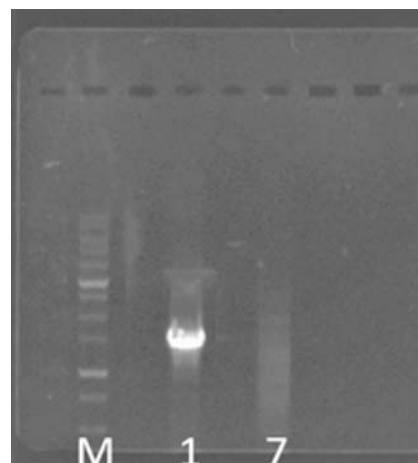


Рис. 1. Электрофорез в 1,2% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации, 1 – ген ксиланазы, 7 – ген целлюлазы

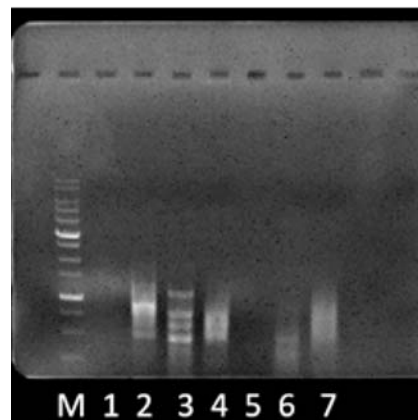


Рис. 2. Электрофорез в 1,2% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации. 1 – Taq-полимераза и буфер А фирмы Диаэм (Россия); 2 – Taq-полимераза и буфер Б фирмы Диаэм (Россия); 3 – Taq-полимераза фирмы Диаэм (Россия) и GC-богатый буфер фирмы Thermo Fisher Scientific (США); 4 – Taq-полимераза и буфер Таq фирмы SibEnzyme (Россия); 5 – Taq-полимераза фирмы SibEnzyme (Россия) и буфер А фирмы Диаэм (Россия); 6 – Taq-полимераза фирмы SibEnzyme (Россия) и GC-богатый буфер компании Thermo Fisher Scientific (США); 7 – Taq-полимераза фирмы Диаэм (Россия) и буфер Таq фирмы SibEnzyme (Россия)

Был произведен препаративный электрофорез полученных ампликонов, продукты были очищены и переданы на секвенирование. Анализ сиквенса генов ксиланазы и целлюлазы подтвердил, что были амплифицированы интересные нас гены. Были написаны экспрессионные праймеры для клонирования генов ксиланазы и целлюлазы в бактериальный вектор pQE-30.

Мутации в С-концевом домене Н⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее функционирование

Петров В.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино,
vpetrov07@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38356

Одним из жизненно важных ферментов дрожжевой клетки является АТФаза плазматической мембраны (PMA1), кодируемая геном *PMA1*, нокаут которого для клетки летален. Этот фермент гидролизует АТФ с образованием макроэргического интермедиата, в результате чего происходит *каталитическое* фосфорилирование консервативного остатка Asp-378, и создаёт электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), энергия которого используется для активного вторичного транспорта веществ. Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы: при добавлении глюкозы к клеткам фермент активируется; при этом происходит *регуляторное* фосфорилирование молекулы АТФазы. В основном фосфорилируются остатки Ser, был также обнаружен фосфотреонин (Chang, Slayman, 1991). Предполагается, что в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 аминокислотных остатков, из которых точно установлены только три (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015). Важным доменом этого фермента является С-концевой участок молекулы, являющийся регуляторным; глюкозо-зависимая регуляция активности Н⁺-АТФазы дрожжей («глюкозный эффект») связана с фосфорилированием расположенных там остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до настоящего времени не установлена. Таким образом, представлялось важным выяснить, влияют ли замены других потенциально фосфорилируемых остатков, расположенных в С-концевой части фермента на его активность и регуляцию. Было выбрано несколько таких остатков, находящихся в короткой экстрацитозольной петле 846-SENWTD, проведен аланин-сканирующий мутагенез и получены мутанты S846A, E847A, T850A и D851A.

PMA1 АТФаза синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и через аппарат Гольджи и секреторные везикулы достигает плазматической мембраны. На этом секреторном пути находятся пункты контроля качества и если фолдинг фермента был серьезно нарушен, такой белок отбраковывается. Поэтому было важно оценить, влияют ли введенные мутации на экспрессию фермента в плазматических мембранах и, как следствие, на его биогенез. Как видно из табл. 1, биогенез мутантных ферментов не был серьезно нарушен.

Для того, чтобы оценить, как функционирует фермент, имеющий замены изучаемых остатков, дикая и мутантные формы фермента были экспрессированы на уровне плазматической мембраны и была измерена АТФазная активность препаратов плазматических мембран, выделенных из голодающих клеток и клеток, метаболизирующих глюкозу (табл. 1). Базовая активность АТФазы мутантных штаммов наиболее выразительно отличалась от таковой дикого типа в случае S846A (увеличение) и D851A (уменьшение, табл. 1). В остальных случаях базовая активность менялась незначительно. На основании этих данных можно предположить, что в штамме S846A АТФаза частично активирована даже в отсутствие глюкозы, в то время как мутация D851A приводила к снижению активности фермента. Присутствие

глюкозы приводило к более выраженному влиянию замен на функционирование АТФазы. В штамме с заменой S846A глюкозный эффект был ясно выражен и уровень активности фермента при сбраживании глюкозы даже превышал таковой у родителя; однако, вследствие того, что базовая активность мутанта была выше родительской, степень активации мутантного фермента S846A была несколько ниже, чем у родителя (3,5 и 4,5 раза, соответственно; табл. 1). У трех других мутантных ферментов (E847A, T850A и D851A) уровень гидролиза АТФ в активированном состоянии был ниже более чем в два раза по сравнению с диким типом. Это может указывать на изменения во взаимодействия молекулы АТФазы, несущей замены, с липидным микроокружением, различными частями фермента и/или соседними белками. Недавно было показано, что молекулы АТФазы образуют гексамер, где мономеры взаимодействуют друг с другом, в частности через фосфорилирующий и регуляторный домены (5-6 Heit et al., 2021; Zhao et al., 2022). Нельзя исключить, что во взаимодействии принимают участие и экстрацитозольные части фермента, в частности, потенциально фосфорилируемые остатки, образующие петлю 846-SENWTD, поэтому такой эффект может быть обусловлен и нарушением фосфорилирования АТФазы.

Очевидно, для слаженной работы PMA1 АТФазы необходимо наличие нескольких фосфосайтов, из которых главными являются Ser-911 и Thr-912; при удалении этих фосфосайтов или их замене на фосфосайты другого типа (Ser/Thr → Asp) происходят масштабные изменения как в функционировании фермента (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015; Tomashevsky, Petrov, 2022), так и в энергетическом метаболизме в целом (Tomashevsky, Petrov, 2022). Данные, представленные в настоящей работе, предполагают, что в общем процессе регуляции участвуют дополнительные фосфосайты, в том числе и изучаемые; при отсутствии этих фосфосайтов происходит расогласованность функционирования PMA1 АТФазы.

Таблица 1

Влияние мутаций на экспрессию PMA1 АТФазы *S. cerevisiae* NY13 и ее активность в присутствии (+) и в отсутствие (-) глюкозы (%)

Штамм	Экспрессия		АТФазная активность	
	-	+	-	+
NY13	100	103	100	449
S846A	113	122	144	505
E847A	84	74	90	178
T850A	68	61	110	195
D851A	62	63	71	174

Литература

1. Chang A., Slayman C.W. J. Cell. Biol. 1991. V. 115. P. 289–295.
2. Heit S., Geurts M.M.G., Murphy B.J., Corey R.A., Mills D.J., Kühlbrandt W., Bublitz M. Science Advances. 2021. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1126/sciadv.abj5255
3. Lecchi S., Allen K.E., Pardo J.P., Mason A.B., Slayman C.W. Biochemistry. 2005. V. 44. P. 16624–16632.
4. Lecchi S., Nelson C.J., Allen K.E., Swaney D.L., Thompson K.L., Coon J.J., Sussman M.R., Slayman C.W. J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 35471–35481.
5. Mazon M.J., Eraso P., Portillo F. FEMS Yeast Research. 2015. V. 15. P. 1–9.
6. Tomashevsky A.A., Petrov V.V. J. Biomol. Struct. Dynam. 2022. V. 40. P. 635–647.
7. Zhao P., Zhao C., Chen D., Yun C., Li H. Nature Communications. 2021. V. 12. P. 6439–6511.

Внутренняя асимметрия сайта связывания транскрипционных факторов LysR-семейства

Позднякова-Филатова И.Ю., Захарова М.В.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
irafilatova24@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38357

Транскрипционные регуляторы LysR-семейства (LTTR) взаимодействуют с регуляторной областью целевых генов в районе -35 бокса σ 70-зависимого промотора. Это позволяет эффективно конкурировать с РНК-полимеразой, что приводит к репрессии транскрипции. В присутствии индуктора один из гетеродимеров гомотетрамера высвобождает -35 бокс, что позволяет закрепиться РНК-полимеразе на промоторе, удерживаясь, в том числе, за счет контакта с транскрипционным регулятором. LTTR защищают от действия ДНКазы (при постановке DNase footprinting) 2 участка, которые в литературе называют RBS (recognition/repression binding site) и ABS (activation binding site). В районе высокоаффинного RBS обнаруживают вырожденный палиндром с характерным для LTTR паттерном T-N₁₁-A, в районе низкоаффинного ABS, который перекрывается с -35 боксом промотора, палиндром отсутствует. То есть палиндром не является центром связывания гомотетрамера, что может указывать на наличие внутренней асимметрии, которая позволяет «правильно» расположить один из димеров downstream относительно сайта RBS.

Объектом исследования выступил *sgp*-оперон, содержащий гены катаболизма салицилата, транскрипционным регулятором *sgp*-оперона является белок SgpR, ген которого дивергентно транскрибируется относительно оперона. Ранее было показано, что в *in vitro* системе в отсутствие SgpR функционирует только его собственный промотор, в то время как с промотора *sgp*-оперона транскрипция не идет. В присутствии белка SgpR репрессируется процесс транскрипции с обоих промоторов, а в присутствии белка SgpR и салицилата запускается процесс транскрипции с промотора *sgp*-оперона. SgpR защищает от действия ДНКазы 2 сайта, как и остальные охарактеризованные LTTR, между сайтом RBS и ABS возникает гиперчувствительный участок, что свидетельствует об изгибании фрагмента ДНК и что ранее было показано для представителей LTTR.

Показано, что для образования комплекса SgpR-ДНК достаточно только сайта RBS, причем удаление сайта ABS не влияет на стехиометрию комплекса.

Были получены фрагменты регуляторной области, содержащие оба сайта (образец RBS_ABS), только один сайт (образец onlyRBS) и перевернутый на 180° относительно сайта ABS сайт RBS (образец flipRBS). Обнаружено, что при переворачивании сайта RBS пропадает гиперчувствительный участок между сайтами RBS и ABS, а также выраженность сайта ABS, и появляется новый гиперчувствительный участок upstream RBS. Однако это не приводит к возникновению нового низкоаффинного сайта. По-видимому, взаимодействие с низкоаффинным сайтом ABS происходит не только из-за направленного расположения гомотетрамера за счет внутренней асимметрии, но еще из-за дополнительных неспецифических контактов с ДНК, которые пока не охарактеризованы.

Создание и функциональный анализ рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих ген мутантного цитохрома P450 BM3

Пошехонцева В.Ю., Стрижов Н.И., Сазонова О.И., Николаева В.М., Шутов А.А., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
rikahameleon@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38358

Стероидные С7 β -спирты и их соответствующие эфиры проявляют нейропротекторные и противовоспалительные свойства, что делает их перспективными для лечения острых и хронических повреждений нейронов, таких как инсульт, травмы мозга и церебральная ишемия [1], приводя к высокому спросу на них на фармацевтическом рынке. 7 β -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (7 β -ОН-АД) является предпочтительным предшественником для синтеза целого ряда 7 β -ОН-стероидов [2].

Регио- и стереоспецифическое гидроксирование С-Н-связей в молекуле стероидов является одной из ключевых реакций для их функционализации, тем самым определяя эффективность способов получения терапевтически ценных гидроксипроизводных стероидов. Селективный химический синтез гидроксистероидов, как правило, чрезвычайно затруднителен, что обуславливает актуальность разработки микробиологических подходов. Наиболее эффективное гидроксирование стероидов осуществляют монооксигеназы суперсемейства цитохромов P450 (CYP) [3].

Цитохром P450 BM3 (CYP102A1), выделенный из *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*), является наиболее изученным представителем VIII класса цитохромов P450, характерная особенность которых заключается в слиянии окислительно-восстановительных партнеров – цитохрома P450 и цитохром-P450-редуктазы, в одной белковой молекуле, обеспечивая быстрый перенос электронов от флавина к гему. Среди известных в настоящее время CYP450 для CYP102A1 показана наиболее высокая каталитическая активность (17000 оборотов в минуту). Нативный P450 BM3 участвует в гидроксировании средне- и длинноцепочечных жирных кислот и не вовлечен в метаболизм стероидов [4]. С помощью белковой инженерии был получен мутантный CYP102A1 (CYP102A1-LG23), в ген которого были введены 14 мутаций, определяющих специфичность фермента при гидроксировании стероидных субстратов в С7-положении [1].

Целью исследования явилось создание рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3), гетерологически экспрессирующих кДНК CYP102A1-LG23, и оценка функциональности белка *in vivo* по способности продукции 7 β -гидроксиандрост-4-ен-3,17-диона из андрост-4-ен-3,17-диона (АД).

Кодирующие последовательности полного мутантного цитохрома CYP102A1-LG23 дикого типа и оптимизированного для последующей экспрессии в микобактериях были клонированы в плазмидный вектор pET28a с образованием рекомбинантных плазмид pETT3 и pETT1, соответственно. Поскольку цитохром P450 BM3 является НАДФН-зависимым ферментом [4], на основе вектора pRSFDuet-1 была сконструирована рекомбинантная плаزمида pRD3, содержащая бицистронный оперон, кодирующий оптимизированные последовательности цитохрома CYP102A1-LG23 и глюкозодегидрогеназы GDH, необходимой для цикла регенерации НАДФ⁺ в НАДФН. Все вышеперечисленные последовательности были синтезированы химически (GenScript).

Полученные конструкции были перенесены в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) путем трансформации. Экспрессию кДНК целевых генов подтверждали SDS-ПААГ электрофорезом. Определение активности ферментов *in vivo* осуществляли в жидкой среде ТВ, содержащей 50 мг/л канамицина. Синтез белков индуцировали добавлением 0,2 мМ ИПТГ по достижении культурой плотности 0,6-0,8 (OD₆₀₀). В качестве субстрата биоконверсии использовали АД (200 мг/л), который вносили вместе с индуктором метил- β -циклодекстрином (мЦД) в соотношении 1:3 моль/моль или в растворителе – диметилсульфоксиде (ДМСО) (0,3% об./об.). В ходе процесса биотрансформации осуществляли ежедневную подпитку раствором глюкозы по 10 г/л. Культивировали при 25 °С и 200 об/мин в течение 72 ч. Стероидные экстракты анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ.

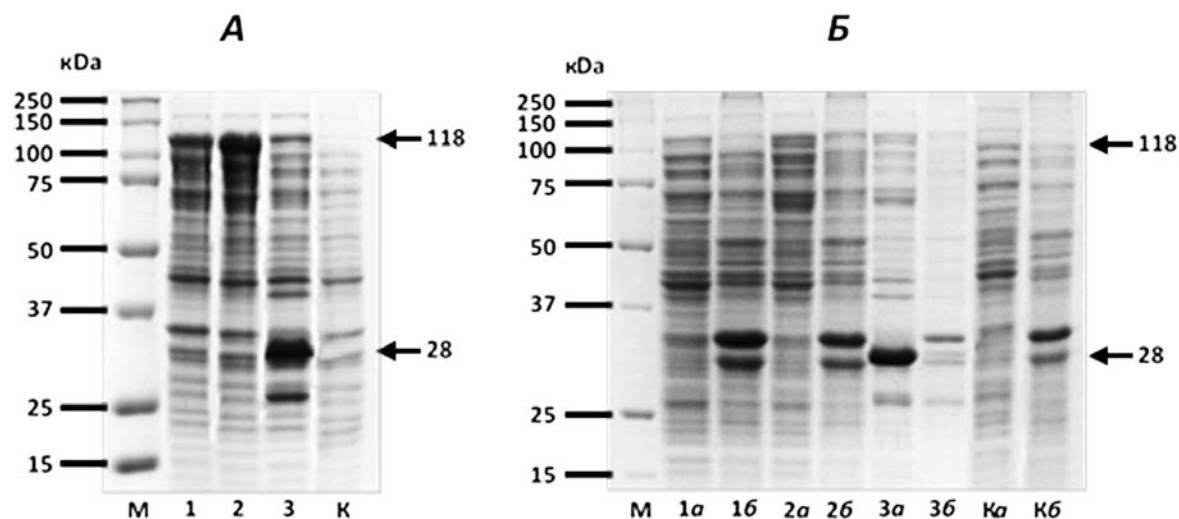


Рис. 1. Электрофореграмма белков рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21 (DE3): (А) – в гомогенате, (Б) – в клеточных фракциях. М – маркер молекулярных масс, К – контроль (pET28a), 1 – pETT1, 2 – pETT3, 3 – pRD3, а – супернатант, б – дебрис. Стрелками указаны белки: P450 BM3 LG23 (118 кДа) и GDH (28 кДа)

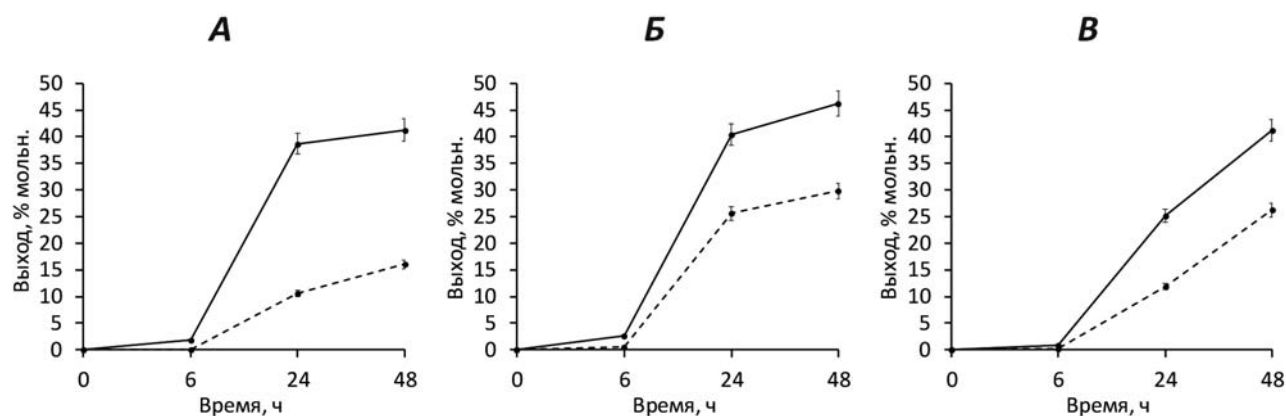


Рис. 2. Динамика образования 7β-ОН-АД в культурах рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21(DE3), несущих плазмиды pETT1 (А), pETT3 (Б) и pRD3 (В), в присутствии ДМСО (—●—) и мЦД (---●---)

Экспрессия CYP102A1-LG23 в рекомбинантных штаммах *E. coli* существенно увеличивалась в ряду pRD3 < pETT1 < pETT3 (рис. 1а). Оба белка преимущественно представлены в растворимой фракции (рис. 1б). Выход продукта не имел значительных отличий между трансформантами (рис. 2). Несмотря на невысокий уровень экспрессии CYP102A1-LG23 в культуре *E. coli* BL21(DE3) (pRD3), его активность повышалась за счет ко-экспрессии глюкозодегидрогеназы, обеспечивающей регенерацию НАДФН.

Значительное влияние на эффективность биопроцесса оказывает способ внесения субстрата (рис. 2). Как показал ВЭЖХ-анализ экстрактов стероидов из культуральной жидкости, выход 7β-ОН-АД при использовании ДМСО повышается от 1,6 до 2,6 раз, по сравнению с таковым при использовании мЦД, и составляет 42,9±2,9% мольн. При этом титр целевого вещества в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов, несущих моноцистронные плазмидные конструкции pETT1 и pETT3, выходит на плато после 24 ч культивирования (рис. 2а и 2б, соответственно), тогда как для штамма, трансформированного pRD3, содержащей бицистронную экспрессионную кассету генов, это время, по-видимому, смещается на одни сутки (рис. 2в). Эпимер 7α-ОН-АД не обнаруживался или присутствовал в следовых количествах (не более 0,08% мольн.).

Таким образом, впервые сконструированы три рекомбинантных штамма *E. coli*, несущих плазмидные конструкции: pETT1 и pETT3, содержащие оптимизированный и дикий гены *cyp102A1-LG23*; и pRD3, несущую бицистронную кассету оптимизированных генов *cyp102A1-LG23* и *gdh*. Полученные транс-

форманты проводили биоконверсию АД с образованием 7 β -ОН-АД с высокой селективностью и выходом свыше 45% мольн.

Результаты важны для последующей разработки технологии получения предшественников терапевтически ценных стероидных соединений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-64-00024).

Литература

1. Li A., Acevedo-Rocha C.G., D'Amore L., Chen J., Peng Y., Garcia-Borràs M., Gao C., Zhu J., Rickerby H., Osuna S., Zhou J., Reetz M.T. Regio- and Stereoselective Steroid Hydroxylation at C7 by Cytochrome P450 Monooxygenase Mutants // *Angewandte Chemie International Edition*. 2020. 59(30), 12499–12505. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1002/ange.202003139
2. Zhao Y.-Q., Liu Y.-J., Ji W.-T., Liu K., Gao B., Tao X.-Y., Zhao M., Wang F.-Q., Wei D.-Z. One-pot biosynthesis of 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterols by cofactor regeneration system in engineered *Mycolicibacterium neoaurum* // *Microbial Cell Factories*. 2022. 21, 59. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1186/s12934-022-01786-5
3. Карпов М.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутов А.А., Казанцев А.В., Стрижов Н.И., Донова М.В. Конструирование и функциональный анализ рекомбинантных штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*, несущих гены бациллярных цитохромов CYP106A1 и CYP106A2 // *Биотехнология*. 2021. 37(6), 34–47. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.21519/0234-2758-2021-37-6-34-47
4. Finnigan J.D., Young C., Cook D.J., Charnock S.J., Black G.W. Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2020. 122, 289–320. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/bs.apcsb.2020.06.005.

Гены, вовлеченные в синтез трегалолипидов в штамме *Rhodococcus qinqshengii* F2-2

Пунтус И.Ф., Позднякова-Филатова И.Ю., Делеган Я.А., Ахметов Л.И., Абрамова Т.Н.,
Захарова М.В., Филонов А.Е.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
puntus66@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38359

Для представителей рода *Rhodococcus* характерно образование поверхностно-активных веществ в ответ на присутствие алканов в среде культивирования. Эти ПАВ представляют собой гликолипиды, содержащие невосстанавливающий дисахарид трегалозу, с которой сложноэфирными связями соединены жирные кислоты. Трегалоллипиды также синтезируют представители родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и *Nocardia*. Трегалоза образуется в результате превращения молекул глюкозы во фруктозу с последующим расщеплением на триозы, которые в ходе основного и альтернативного путей превращаются в трегалозу. При этом глюкоза, являющаяся исходным субстратом для образования трегалозы, образуется в ходе глюконеогенеза. Вторым обязательным компонентом биоПАВ являются жирные кислоты. Их образование может происходить разными путями (в частности, в результате деградации алифатических углеводов, либо из ацил-КоА, который в свою очередь образуется в результате β -окисления жирных кислот). Самым неизученным этапом синтеза трегалолипидов является последняя стадия взаимодействия трегалозы с жирной кислотой. На данный момент имеется только одна статья (Inaba et al., 2013) в которой исследуются гены, задействованные в биосинтезе трегалолипидов у *Rhodococcus*. В этом исследовании идентифицированы новые типы генов, участвующих в биосинтезе сукциноилтре-

галолипидов: (ацил-КоА) трансфераза (*tlsA*), фруктозо-бисфосфатаальдолаза (*fdA*) и алканмонооксигеназа (*alkB*). Предсказанные функции этих генов указывают на важность метаболизма алканов, синтеза сахара и добавления ацильных групп для биосинтеза сукциноилтрегалолипидов.

Штамм *Rhodococcus qingshengii* F2-2 является типичным представителем углеводородокисляющих родококков. При росте на гексадекане продуцирует значительное количество трегалолипидов. Микроорганизм выделен из почвы с нефтяного месторождения «Фестивальное» (ЯНАО, Западная Сибирь) (Puntus et al., 2019). Секвенирование генома *Rhodococcus* sp. F2-2 выполнено с использованием технологий Oxford Nanopore Technologies и Illumina MiSeq. Геном состоит из хромосомы размером 6.3 млн.п.н. и трех плазмид размером 156 т.п.н., 209 т.п.н. и 337 т.п.н., из которых одна кольцевая рCP209 и две линейные рLP156 и рLP337. Из 6741 обнаруженных CDS 5234 могут быть отнесены к двадцати пяти различным категориям кластеров ортологов (COGs). Эти результаты подтверждают, что штамм *Rhodococcus qingshengii* F2-2 обладает эффективным липидным, углеводным, аминокислотным транспортом и метаболизмом.

В геноме штамма *Rhodococcus qingshengii* F2-2 был выполнен поиск генов, вовлечённых в катаболизм углеводов и продукцию поверхностно-активных соединений. Показано, что в геноме содержится пять генов алканмонооксигеназ (*alkB*) и три гена ацилтрансфераз (*TlsA*, trehalose-2-sulfate acyltransferase). Один из генов, *alkB1* входит в состав кластера, содержащего два гена, кодирующего рубредоксины, ген, кодирующий рубредоксинредуктазу, и транскрипционный регулятор TetR-семейства. Еще один похожий по составу кластер генов содержит *alkB2* и отличается от кластера, описанного выше, лишь отсутствием гена рубредоксинредуктазы. Ортолог *alkB3* расположен в непосредственной близости от гена, кодирующего гипотетический белок размером 12.7 кДа: их рамки считывания перекрываются. Ортолог гена *alkB4* расположен upstream от гена *gltX*, кодирующего глутамат-тРНК-лигазу, и двух тРНК (tRNA-Gln and tRNA-Glu), сонаправленных кластеру *alkB4-gltX*. Ортолог гена *alkB5* стоит обособленно, относительно окружающих его генов.

Алканмонооксигеназа, описанная в 2013 году Tomohiro Inaba с соавторами, участвует в синтезе биоПАВ у *Rhodococcus* sp. strain SD-74 и является ортологом *AlkB1*. Для бактерий *Rhodococcus* sp. SD-74 показана роль продукта гена *alkB* в синтезе биоПАВ.

Как было упомянуто выше, в геноме штамма *Rhodococcus qingshengii* F2-2 содержатся три гена ацилтрансфераз (*TlsA*, trehalose-2-sulfate acyltransferase). Ген *tlsA1*, который больше всего похож на *tlsA* штамма SD-74, имеет размер 1494 п.н. (*TlsA1*, соответственно, 497 аминокислот) и перекрывается на один нуклеотид с рамкой считывания гена downstream, кодирующего нерибосомальную пептид синтетазу. Ортологи *tlsA1*, имеющие схожее генное окружение, обнаруживаются в 46 геномах родококков из 101, по данным веб-сервера SyntTax. Ген *tlsA2* имеет размер 1173 п.н. (*TlsA2*, соответственно, 390 аминокислот) или 1467 п.н. (*TlsA2*, соответственно, 488 аминокислот) (в разных геномах начало ортологичного гена определено по-разному) и, вероятно, входит в состав одного оперона с двумя другими генами, расположенными upstream и downstream и кодирующими condensation domain-containing proteins. Ортологи *tlsA2*, имеющие схожее генное окружение, обнаруживаются в 32 геномах родококков из 101. С помощью веб-сервера SyntTax обнаружили еще один предполагаемый ген *tlsA3*, который имеет размер 1401bp (*TlsA3*, соответственно, 466 аминокислот) и вероятнее всего входит в состав одного оперона с двумя другими генами upstream, кодирующими cysteine desulfuration protein SufE и thiosulfate sulfurtransferase. Ортологи *tlsA3*, имеющие схожее генное окружение, обнаруживаются в 100 геномах родококков из 101. Мы определили структуру оперона, в который входит ген *tlsA2*, так downstream относительно него расположены еще три гена, кодирующие транскрипционный регулятор MarR-семейства (05405), пероксидазу (05410) и NADH-зависимую оксидоредуктазу (05415).

Таким образом, в геноме штамма *Rhodococcus qingshengii* F2-2 были впервые определены гены, потенциально участвующие в синтезе биоПАВ, к которым были разработаны соответствующие праймеры. для исследования экспрессии генов с помощью RT-qPCR. Экспрессию генов алканмонооксигеназ и ацилтрансфераз оценивали по количеству образующейся мРНК в процессе культивирования на средах с гексадеканом или глюкозой при двух температурах (28 °C и 5 °C). Изучение экспрессии генов алканмонооксигеназ методом ПЦР в реальном времени при 5 °C и 28 °C показало, что в штамме *R. qingshengii* F2-2, культивируемом на гексадекане, ген *alkB3* не функционирует. Остальные гены *alkB1*, *alkB2*, *alkB4*, *alkB5* являются индуцибельными и функционируют при нормальной и при пониженной температуре. При снижении температуры культивирования с 28° до 5 °C статистически значимо

увеличивалось количество мРНК генов *alkB2* и *alkB4*. Количество мРНК генов *alkB1* и *alkB5* не зависело от температуры культивирования. Из трех генов ацилтрансфераз только у гена *tlsA2* количество мРНК в клетках *R. qingshengii* F2-2 коррелировало со снижением поверхностного натяжения среды, он функционировал как при 5°, так и при 28 °С. Гены *tlsA1* и *tlsA3* не функционировали при 5 °С.

В дальнейшем планируется установить вклад в синтез сукциноил трегалолипидов всех 3-х предполагаемых ацетилтрансфераз штамма *Rhodococcus qingshengii* F2-2.

Литература

1. Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74. Applied and Environmental Microbiology. 2013. Vol. 79, № 22. P. 7082–7090.
2. Puntus I.F., Borzova O.V., Funtikova T.V., Suzina N.E., Egozarian N.S., Polyvtseva V.N., Akhmetov L.I., Golovleva L.A., Solyanikova I.P., Shumkova E.S. Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation Journal of Soils and Sediments. 2019. V. 19. No 8. P. 3166–3177.

Трансформация клеток *Escherichia coli* для конъюгативного переноса плазмидной ДНК в *Rhodococcus qingshengii* X5

Режепова А.А.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.², Петриков К.В.²

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино,
liregepova@gmail.com

²ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38360

Rhodococcus qingshengii X5 показал себя как эффективный деструктор широкого спектра алканов, приспособленный к низким положительным температурам. Было обнаружено, что геном *R. qingshengii* X5 содержит 5 копий гена *alkB*, кодирующего алканмонооксигеназу. Известно, что гены этого класса могут являться ключевыми для деградации алканов, однако в настоящее время не ясна роль наличия в геноме нескольких гомологичных копий этого гена.

Одним из вариантов выявления роли гена может быть сравнение штамма *R. qingshengii* X5 дико-го типа с мутантным с делецией гена *alkB1* в геноме. Для этого ранее была сконструирована плазида pJQ200KSΔ*alkB1*, содержащая делецию гена *alkB1*, селективный маркер в виде устойчивости к гентамицину, а также контрселективный маркер (чувствительность к сахарозе, *sacB*). Поскольку ранее трансформация *R. qingshengii* X5 этой плазмидой методом электропорации оказалась низкоэффективной, было принято решение использовать для этой цели конъюгацию. Для этого нужно было решить следующие задачи: выбор конъюгативных штаммов-доноров, получение химически- и электрокомпетентных клеток, выбор условий трансформации, отбор сахарозочувствительных клонов для скрещивания, подбор условий для конъюгации и оценка результатов скрещивания.

В качестве доноров были выбраны штаммы *Escherichia coli* S17-1, BW19851 и MFDλpir, содержащие все необходимые элементы для конъюгативного переноса. В качестве мобилизуемых плазмид использовались pJQ200KSΔ*alkB1* и pUC18 (в качестве контроля). Для внесения плазмидной ДНК в клетки *E. coli* применялись два подхода: химическая трансформация (тепловой шок) и электропорация. В работе химически компетентные клетки готовились двумя способами: обработка хлоридом кальция и хлоридом рубидия.

Полученные клоны проверялись на чувствительность к сахарозе. Ген *sacB* кодирует левансукразу, синтезирующую из сахарозы леван, который является токсичным. Наличие данного гена приводит к гибели бактерий при культивировании в присутствии сахарозы, что позволяет проводить контрселек-

цию. При утрате чувствительности контрселекция будет невозможна, поэтому проверка клонов необходима для дальнейшей работы.

Наибольшая эффективность трансформации была достигнута для химически компетентных клеток BW19851 с обработкой хлоридом кальция и электрокомпетентных клеток S17-1. Эффективность химической трансформации штамма *E. coli* MFD λ rig также была высокой, но все полученные клоны оказались устойчивы к сахарозе.

Были подобраны концентрации налидиксовой кислоты и гентамицина – 10 мкг/мл и 80 мкг/мл – для проведения скрещивания и отбора полученных трансконъюгантов *R. qingshengii* X5.

Конъюгация была поставлена с сахарозочувствительными клонами *E. coli* S17-1 и BW19851, содержащих плазмиду pJQ200KSDalkB1, и *R. qingshengii* X5. Трансконъюгантов *R. qingshengii* X5 получить не удалось.

В дальнейшем планируется модификация методик получения компетентных клеток и подбор условий для проведения трансформации и конъюгации.

Новые структурные особенности алкалофильных грибных лакказ

Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН),
zhanna.renfeld@yandex.ru; mpkolomytseva@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38361

Лакказа (К.Ф.1.10.3.2, *пара*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) – фермент семейства голубых медь-содержащих оксидаз, способный окислять широкий спектр фенольных и нефенольных, в том числе неорганических соединений. Большинство лакказ найдены у бактерий, грибов и растений. В течение последних десятилетий лакказы привлекают большое внимание исследователей из-за возможности их широкого применения в промышленности.

Для биотехнологического применения наиболее востребованы ферменты с высоким окислительно-восстановительным потенциалом и широкой субстратной специфичностью, высокой стабильностью, отсутствием необходимости использования кофакторов и медиаторов. По имеющимся литературным данным, именно грибы являются продуцентами средне- и высокоредокспотенциальных лакказ, способных окислять широкий ряд субстратов различной природы. Однако максимальную активность типичные грибные лакказы проявляют в кислой области рН, что затрудняет их использование в большом количестве биотехнологических процессов, протекающих в нейтрально-щелочном окружении, таких как биосинтез фармакологически ценных соединений в клеточных платформах (Kudanga et al., 2011) или синтез С-N гетерополимерных красителей (Xu et al., 2000), биосенсоры для детекции полифенольных соединений в биологических жидкостях (Pezzella et al., 2015), биотопливные элементы для имплантируемых устройств, работающих в физиологических средах организма (Pezzella et al., 2015), 3D-наноразстройства для биомедицинских целей (Mate et al., 2013) и многие другие.

Показано, что увеличение значения рН в водной среде приводит к снижению редокс-потенциала ряда субстратов и, соответственно, к повышению их доступности для лакказ. В тоже время в нейтрально-щелочных условиях среды усиливается связь гидроксид-аниона с Т2/Т3 медным центром лакказы, что приводит к ингибированию переноса электронов от Т1 к Т2/Т3 медному центру и снижению активности фермента вплоть до полного его ингибирования (Xu et al., 1997). Тем не менее, было найдено небольшое число грибных лакказ, проявляющих максимальную активность в нейтральной или щелочной среде, однако механизм их толерантности к повышенным значениям рН остается малоизученным.

Целью настоящей работы являлся поиск структурных факторов, определяющих каталитическую активность алкалофильных лакказ в нейтрально-щелочных условиях среды.

На основе ранее полученной полной аминокислотной последовательности алкалофильной лакказы *Myrothecium roridum* было проведено гомологическое моделирование ее пространственной структуры. Структурный анализ полученной модели показал, что она содержит три купредоксин-подобных домена и способна связывать четыре атома меди в T1 и T2/T3 медных центрах, что типично для всех известных грибных лакказ. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей алкалофильной лакказы гриба *M. roridum* и ряда алкалофильных или ацидофильных грибных лакказ, а также сравнение полученной модели и ряда лакказ с известной пространственной структурой позволило выделить два каталитически важных канала: T1/T3 α -канал, осуществляющий связывание субстрата и поступление молекулярного кислорода, и T2-канал высвобождения молекулы воды в результате каталитического процесса.

Расчет и сравнение электростатических потенциалов в молекулах исследуемых лакказ при кислых и нейтральных значениях pH позволил продемонстрировать формирование более отрицательного заряда в нейтральных условиях среды. При этом электростатический потенциал на внутренней поверхности T1/T3 α - и T2-каналов существенно не отличался. Однако была найдена новая ранее неисследованная полость в молекулах алкалофильных лакказ, которая сохраняет свой положительный заряд при pH 7.0 (в отличие от ацидофильных лакказ), предположительно выполняющая роль буфера протонов для функционирования каталитических аминокислотных остатков в T2/T3-металлоцентре и способствующая сохранению активности подобных ферментов в нейтрально-щелочных условиях среды.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059 и гранта фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по проекту «УМНИК-2021» (№ 17366ГУ/2022 (номер 0074517)).

Литература

1. Kudanga T.G., Nyanhongo S., Guebitz G.M., and Burton S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review // *Enz. Microbiol. Technol.* – 2011. V. 48. P. 195–208.
2. Mate D.M., Gonzalez-Perez D., Kittl R., Ludwig R. Functional expression of a blood tolerant laccase in *Pichia pastoris* // *BMC Biotechnology.* – 2013. V. 13. № 1. P. 38.
3. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. How to enjoy laccases // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. V. 72. P. 923–940.
4. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // *J. Biol. Chem.* – 1997. V. 272. № 2. P. 924–928.
5. Xu F. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds / F. Xu, J.J. Kulys, K. Duke, K.C. Li, K. Krikstopaitis, H.-J.W. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte, P. Schneider // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. V. 66. P. 2052–2056.

Характеристика взаимодействия белков нуклеида микроорганизма *Pseudomonas putida* BS3701 с регуляторной областью генов катаболизма нафталина

Рыжих Ю.С.¹, Иванова Е.В.^{1,2}, Фролова А.А.², Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹ Пушинский Государственный естественно-научный институт, г. Пушино

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
irafilatova24@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38362

Микроорганизм-нефтедеструктор *Pseudomonas putida* BS3701 способен трансформировать полиароматические углеводороды. Метаболический путь катаболизма нафталина протекает с участием ферментов, гены которых находятся как на плазмиде, так и на хромосоме. Кластер генов, ответственный

за трансформацию нафталина до салицилата – $P_{nahAabcdBFCQED}$ имеет плазмидную локализацию. Кластер генов, отвечающий за трансформацию салицилата в интермедиаты ЦТК – $P_{nahUcatAIIINAD(P)}$ – расположен на хромосоме. Регуляция этих генов изучена только в части специфических регуляторов, активирующих процесс транскрипции в присутствии салицилата. В данной работе мы показали, что в начале экспоненциальной фазы роста активность катаболических генов значительно ниже, в сравнении с поздней экспонентой, ранним и поздним стационаром. Это указывает на участие глобальных регуляторов, данные о влиянии которых в литературе отсутствуют.

Объектом нашего исследования стали белки нуклеоида (NAPs, Nucleoid-associated proteins) штамма *Pseudomonas putida* BS3701. Согласно литературным данным, для белков нуклеоида характерна зависимость их количества от фазы роста культуры. Мы проанализировали геном *Pseudomonas putida* BS3701 и обнаружили 13 генов, кодирующих белки нуклеоида.

Гомологи		Высокая степень сходства по базе данных RefSeq	Референсный штамм
Ортологи изученных белков	Паралоги в геноме <i>P. putida</i> BS3701		
MvaT_10	MvaT_22, MvaT_34, MvaT_39, MvaT_41		<i>P. aeruginosa</i> PAO1
HUb	HUa, HUn		<i>E. coli</i> K12
IHFa			<i>E. coli</i> K12
IHFb			<i>E. coli</i> K12
Fis			<i>E. coli</i> K12
Lrp			<i>P. aeruginosa</i> PAO1
			Dps

Были получены электрофоретически гомогенные препараты белков нуклеоида *Pseudomonas putida* BS3701, информация об используемых штаммах продуцентах и расположении His-tag в таблице ниже.

Белок (GenBank)	Экспрессионная система (штамм/плазида)	Расположение His-tag
MvaT_10 (QLJ15261.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
MvaT_22 (QLJ16316.1)	<i>E. coli</i> M15[pREP4]/pQE60	C
MvaT_34 (QLJ11919.1)	<i>E. coli</i> M15[pREP4]/pQE60	C
MvaT_39 (QLJ12378.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
MvaT_41 (QLJ12538.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
HUa (QLJ14445.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
HUb (QLJ16041.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
HUn (QLJ13446.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
Dps (QLJ13232.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
Fis(QLJ14930.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
Lrp (QLJ14484.1)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET29a	C
IHFa (QLJ16217.1)	<i>E. coli</i> M15[pREP4]/pQE30	N
IHFb (QLJ15602.1)	<i>E. coli</i> M15[pREP4]/pQE30	N

Для проверки способности NAPs образовывать комплекс с регуляторными областями $P_{nahAabcdBFCQED}$ и $P_{nahUcatAIIINAD(P)}$ были получены фрагменты ДНК, меченые карбоксифлуоресцеином. Реакцию связывания ставили в присутствии ДНК тимуса телят в качестве компетитора, что позволило оценивать образование специфических комплексов.

Белок Dps, гетеротетрамер IHFab (как мономеры IHFa/IHFb) не образовывали комплекс ни с одной из регуляторных областей. MvaT₂₂ и MvaT₃₉ образовывали комплекс с $P_{nahAabcdBFCQED}$, но не с $P_{nahUcalAIIAD(P)}$. Оставшиеся белки нуклеоида (MvaT₁₀, MvaT₃₄, MvaT₄₁, HUa, HUb, HUn, Fis, Lrp) образовывали комплекс с обеими регуляторными областями.

С помощью количественной ПЦР, дополненной реакцией обратной транскрипции, было определена зависимость количества мРНК генов белков нуклеоида от фазы роста культуры. В начале экспоненциальной фазы роста все гены, кроме *mvaT39*, экспрессируются менее активно, чем в другие фазы роста. *mvaT39* увеличивал свою активность к поздней экспоненте, после чего, при переходе на ранний стационар, возвращался к состоянию сравнимому с ранней экспонентой.

В литературе белки нуклеоида чаще описывают как репрессоры процесса транскрипции, в то время как мы наблюдаем положительную корреляцию между количеством мРНК генов NAPs и количеством мРНК катаболических генов. В дальнейшем планируется изучить влияние NAPs на процесс транскрипции *in vitro*, что позволит оценить участие белков нуклеоида в регуляции и характер этого участия.

Специфичность CYSTM-белков *Saccharomyces cerevisiae*

Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Звонарев А.Н., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
alla@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38363

Дрожжи обладают слаженной системой реагирования на различные стрессы. К числу многочисленных белков, участвующих в адаптивных процессах у *S. cerevisiae*, относятся Mnc1, кодируемый геном *YBR056W-A*, мембранный белок, необходимый для адаптации к токсической концентрации ионов марганца [1] и его ортолог, кодируемый геном *YDR034W-B*. Эти белки входят в семейство CYSTM, небольших мембранных белков, содержащих богатый цистеином трансмембранный модуль, представители которого в наибольшей степени изучены у растений, где они играют важную роль в устойчивости к абиотическим стрессам [2].

Целью работы было исследование специфичности этих двух белков *Saccharomyces cerevisiae* по отношению к стрессам. В работе использовали штаммы, содержащие GFP-слитые гены, кодирующие Mnc1 и YDR034W-B, а также делеционные мутанты по обоим генам, полученные из коллекций Dharmason и Euroscarf, соответственно.

С помощью штаммов, содержащих GFP – слитые гены, было показано, что в контрольных условиях экспрессия исследуемых белков не обнаруживается, для обоих белков экспрессия характерна

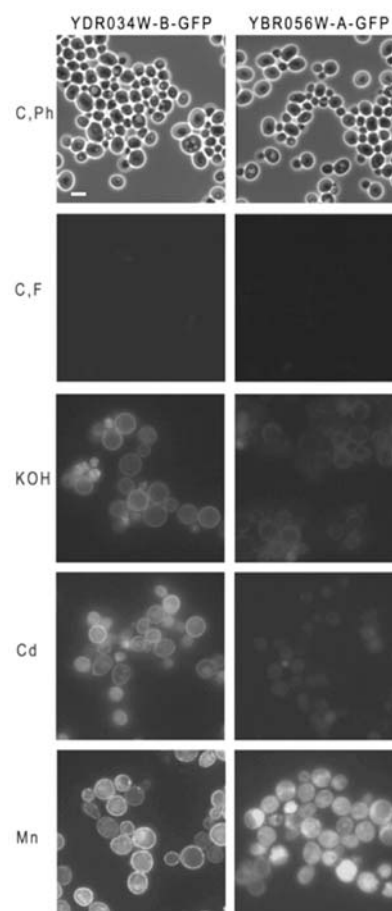


Рис. 1. Микрофотографии клеток штаммов *YBR056W-A-GFP* и *YDR034W-B-GFP*: C, Ph – фазово-контрастная микроскопия, контрольное культивирование на среде YPD в течение 24 ч, C, F – флуоресцентная микроскопия, контрольное культивирование на среде YPD в течение 24 ч, далее – флуоресцентная микроскопия, культивирование на среде YPD в течение 24 ч в присутствии 40 mM KOH, 0.2 mM Cd²⁺, 2 mM Mn²⁺

в присутствии избытка Mn^{2+} , а щелочные условия среды и присутствие Cd^{2+} увеличивают экспрессию YDR034W-B. YDR034W-B обнаружен на периферии клетки, тогда как YBR056W-A локализован преимущественно внутри клетки.

Мы проверили, как влияют ионы кадмия, марганца, а также щелочные условия на рост делеционных мутантов по этим генам и обнаружили, что по концентрации клеток штаммы-нокауты не отличались от родительского штамма в присутствии ионов кадмия или щелочи, а в присутствии ионов марганца концентрация клеток была снижена на 20%, и при микроскопии наблюдали лизис части клеточной популяции.

Вывод

Основная роль белков YDR034W-B и YBR056W-A связана с адаптацией к стрессу, вызванному ионами Mn^{2+} , при этом YDR034W-B, по-видимому, хелатирует эти ионы на уровне цитоплазматической мембраны, тогда как YBR056W-A – на уровне внутриклеточных мембран.

Литература

1. Andreeva N., Kulakovskaya E., Zvonarev A., et al. Metallomics. 2017, 9(2):175–182.
2. Xu Y., Yu Z., Zhang D., et al. Plant Cell Physiol. 2018, 59(2):423–438.

Последние достижения биоинформатики для количественного и функционального анализа данных метагенома и метатранскриптома в микробных сообществах

Соломенникова Ю.Н.

Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург,
yulia.solomennikowa@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38364

Метагеномные и метатранскриптомные методы секвенирования все чаще используются для установления связи между микробиотой и важными заболеваниями и экологическими изменениями. Многие анализы использовались для сравнения таксономических и функциональных профилей микробиоты в разных местах обитания или у разных людей (Qin et al., 2010).

Метатранскриптомный анализ дает еще одно важное представление о деятельности генов, изучая уровни экспрессии генов микробиоты. Таким образом, объединение метагеномного и метатранскриптомного анализов поможет понять активность или обогащение определенного набора генов, например, генов лекарственной устойчивости среди образцов микробиома (Zhang et al., 2017). Здесь мы приводим краткий обзор существующих биоинформационных инструментов для анализа метагеномных и метатранскриптомных данных, цель которого – помочь исследователям выбрать подходящие инструменты для изучения микробиома.

Анализ 16S рРНК является одним из самых популярных и относительно дешевых методов профилирования родового состава микробиоты (Clarridge III, 2004). В этой обзорной статье мы приводим следующие инструменты для анализа 16S рРНК.

Mothur – наиболее популярный инструмент с широкими функциональными возможностями для анализа данных о последовательности сообществ на уровне 16S рРНК. MetaPhlAn2 представляется хорошим полным программным обеспечением, которое можно использовать для анализа на уровне видов; в качестве альтернативы веб-сервер MG-RAST является хорошим вариантом для тех, кто ищет веб-программу для проведения аналогичного анализа. StrainPhlAn представляется приемлемым вариантом для проведения анализа на уровне штаммов, поскольку он основан на программном обеспечении MetaPhlAn2 и имеет множество доступных визуальных выходов для интерпретации результатов анализа.

Хотя метагеномный анализ достиг беспрецедентной производительности в профилировании микробных сообществ, он позволяет исследователям получить доступ только к составу микробных сообществ (Simon & Daniel, 2011). Анализ метатранскриптомных данных может дать представление о профилях экспрессии генов и даже о регуляторных механизмах. Предпочтительно использовать программу MetaTrans, поскольку она специально разработана для метатранскриптомных данных. Однако, если нет ресурсов для поддержки MetaTrans, то humann2 является приемлемой альтернативой и может выполняться как метатранскриптомный, так и метагеномный анализ данных.

Таким образом, интеграция метагеномных и метатранскриптомных инструментов в единый конвейер важна для понимания того, какие виды и какие штаммы конкретного вида присутствуют и какие гены экспрессируются на определенных уровнях. Применение этих подходов к одному микробному сообществу может дать комплексное понимание микробиома и его реакции на окружающую среду, а также предоставить огромное количество информации, которая недоступна ни в одном из существующих метагеномных или метатранскриптомных пайплайнов. Эти методы обеспечивают еще одно направление в изучении биологических процессов, происходящих в микробиомах.

Литература

1. Clarridge III, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.
2. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., & Yamada T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
3. Simon C., & Daniel R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153–1161.
4. Zhang Y., Xie J., Yang J., Fennell A., Zhang C., & Ma Q. (2017). QUBIC: a bioconductor package for qualitative biclustering analysis of gene co-expression data. *Bioinformatics*, 33(3), 450–452.

Физиологические особенности штамма *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppx1

Трилисенко Л.В., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
alla@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38365

Дрожжи являются важным модельным организмом для изучения минерального фосфорного обмена эукариот и ферментов, участвующих в гомеостазе различных форм клеточного фосфора. В число этих ферментов входит полифосфатаза Ppx1, конститутивный белок, локализованный преимущественно в цитоплазме. Исследования функциональной значимости этого белка представляет особый интерес в связи с тем, что он характеризуется высоким сходством с человеческим белком H-rpne, который вовлечен в процессы формирования нервной ткани в эмбриогенезе [1], а также в образование метастазов [2]. Несмотря на многолетнюю историю исследования физико-химических свойств этого белка, вопрос о его функциональном значении остается открытым. Делеционные мутанты этого гена у дрожжей не обнаруживают изменений в жизнеспособности, поэтому с целью выяснения функций этого белка в данной работе мы изучили физиологические особенности штамма *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppx1.

В данной работе использовали штамм CRN, являющийся делеционным мутантом по гену полифосфатазы *Ppn1* [3] и сконструированный на его основе М. Эльдаровым штамм – сверхэкспрессор полифос-

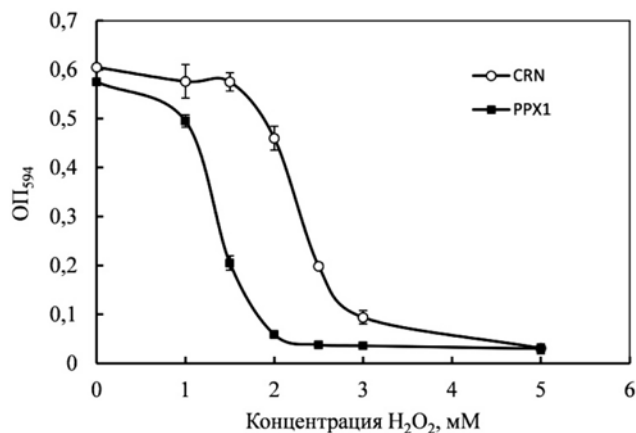


Рис. 1. Оптическая плотность штаммов на стационарной фазе роста в среде YPD с разной концентрацией H₂O₂

ли скорость потребления глюкозы и количество АТФ в клетках обоих штаммов в процессе культивирования.

Оказалось, что скорость потребления глюкозы у обоих штаммов не различалась, тогда как содержание АТФ у штамма CRN/PPX1 снижалось при исчерпании глюкозы медленнее, чем у родительского штамма CRN. Таким образом, к 24 ч культивирования уровень АТФ в клетках штамма CRN/PPX1 был выше по сравнению с родительским штаммом. Очевидно, что это не связано с образованием АТФ. По-видимому, это связано с уменьшением расходования АТФ в клетках штамма CRN/PPX1. Мы проверили активность трех основных АТФаз у обоих штаммов и обнаружили, что активности АТФаз митохондрий и цитоплазматической мембраны у исследуемых штаммов не различались, тогда как активность АТФазы вакуолей у штамма CRN/PPX1 была в 5 раз ниже, чем у родительского штамма. Так как вакуолярная АТФаза является мощным потребителем АТФ, то эти данные могут объяснить сохранение АТФ у штамма CRN/PPX1 в стационарной стадии роста. Отметим, что в использованных нами условиях культивирования (избыток фосфата в среде, 14 мМ фосфата), каких-либо изменений в уровне полифосфатов у штамма CRN/PPX1 не было найдено.

фатазы Ppx1 (CRN/PPX1), содержащий вектор, в котором ген *PPX1* находится под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы [4].

При культивировании на среде YPD штамм CRN/PPX1 не проявил никаких особенностей роста по сравнению с родительским штаммом, однако оказался более чувствительным к перекисному стрессу (рис. 1). Уровень ROS у штамма CRN/PPX1 на стационарной стадии роста при культивировании на среде YPD был почти вдвое выше, чем у штамма CRN. Степень окисленности липидов в этих же условиях роста у штамма CRN/PPX1 был ниже, чем у штамма CRN.

Мы предположили, что клетки штамма CRN/PPX1 сохраняют в стационарной стадии роста некоторые свойства более ранней стадии и провери-

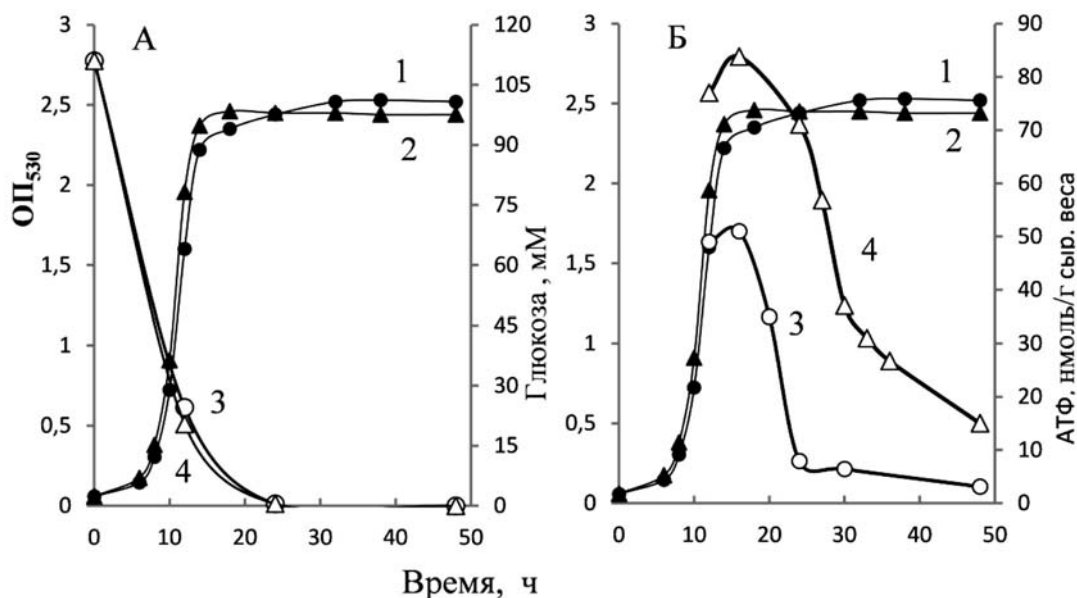


Рис. 2. Рост штаммов CRN и CRN/PPX1 в среде YPD, потребление глюкозы и содержание АТФ в клетках. Обозначения: Рост штаммов 1 – CRN, 2 – CRN/PPX1. А – содержание глюкозы в среде: 3 – CRN, 4 – CRN/PPX1. Б – уровень АТФ в клетках: 3 – CRN, 4 – CRN/PPX1

Вывод

Наблюдаемые физиологические изменения в клетках *S. cerevisiae* при сверхэкспрессии полифосфатазы Ppx1 не связаны с неорганическими полифосфатами, а, вероятно, обусловлены влиянием этого фермента на уровень гидролизующихся им сигнальных соединений, таких как аденозинтетрафосфат и цАМФ.

Литература

1. Middelhaufe S., Garzia L., Ohndorf U.M., et al. Biochem J. 2007, 407(2):199–205.
2. Zollo M., Ahmed M., Ferrucci V., et al. Brain. 2017, 140(4):940–952.
3. Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A. PNAS USA, 2001, 98: 8542–8547.
2. Eldarov M.A., Baranov M.V., Dumina M.V. et al. Biochemistry (Moscow), 78(8): 946–953.

Эволюционное происхождение генов ненасыщенной хондроитин дисахарид-гидролазы семейства GH88 у бактерий *Sphaerochaetaceae*

Трошина О.Ю.¹, Наумов Д.Г.², Щербакова В.А.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
oltro676@yandex.ru

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38366

Исследования по сравнительной геномике демонстрируют широкое распространение горизонтального переноса генов (ГПГ) среди прокариот и его важный вклад в эволюцию геномов. Примерами ГПГ являются приобретение резистентности к антибиотикам у бактерий, способность использовать необычные субстраты, в том числе углеводы, распространение генов фотосинтеза в галофильных археях и бактериях. Масштабные ГПГ были выявлены у кокковидных бактерий порядка *Spirochaetales* *Sphaerochaeta globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T и *Parasphaerochaeta coccoides* SPN1^T. Ранее из устойчивого бинарного консорциума с археей *Methanosarcina mazei* мы выделили и охарактеризовали *S. associata* GLS2^T. В сотрудничестве с Геномным Институтом США (JGI) был секвенирован и собран полный геном этой бактерии (CP094929). Мы предполагаем, что основным источником углерода для *S. associata* GLS2^T в культуре с метаносарциной являются компоненты внеклеточного метанохондроитинового матрикса метаносарцины, состоящего из N-ацетил-D-галактозамина и D-глюкуроновой (и/или D-галактуриновой) кислоты. Вероятно, что способность использовать компоненты метанохондроитина у штамма GLS2^T приобретена в результате ГПГ. Анализ 4-х известных полных геномов *Sphaerochaeta* на активные в отношении углеводов ферменты CAZy (<http://www.cazy.org>) показал, что у всех представителей семейства *Sphaerochaetaceae* за исключением *S. pleomorpha* присутствуют гены, кодирующие белки семейства GH88 (ненасыщенная хондроитин дисахарид-гидролаза/глюкуронил-гидролаза), а также у всех есть белки семейств PL12 и PL33 (гепариназа II/III), которые могут участвовать в деградации олигосахаридов метанохондроитина. В частности хондроитин дисахарид-гидролаза (К.Ф. 3.2.1.180) катализирует отщепление остатка ненасыщенной глюкуроновой кислоты от дисахаридов хондроитина, гиалуроната и гепарина. Целью настоящей работы был филогенетический анализ происхождения генов, кодирующих потенциальную хондроитин дисахарид-гидролазу у бактерий *Sphaerochaetaceae*.

В геноме *S. associata* GLS2^T присутствуют 2 гена, кодирующих хондроитин дисахарид-гидролазы (номера соответствующих белков в базе GenBank UOM52121 и UOM51220), в отличие от единичных копий у остальных известных видов *Sphaerochaetaceae*. У *S. pleomorpha* гена глюкуронил-гидролазы нет. Белки UOM52121 и UOM51220 идентичны на 54%. Оба гена находятся в разных местах хромо-

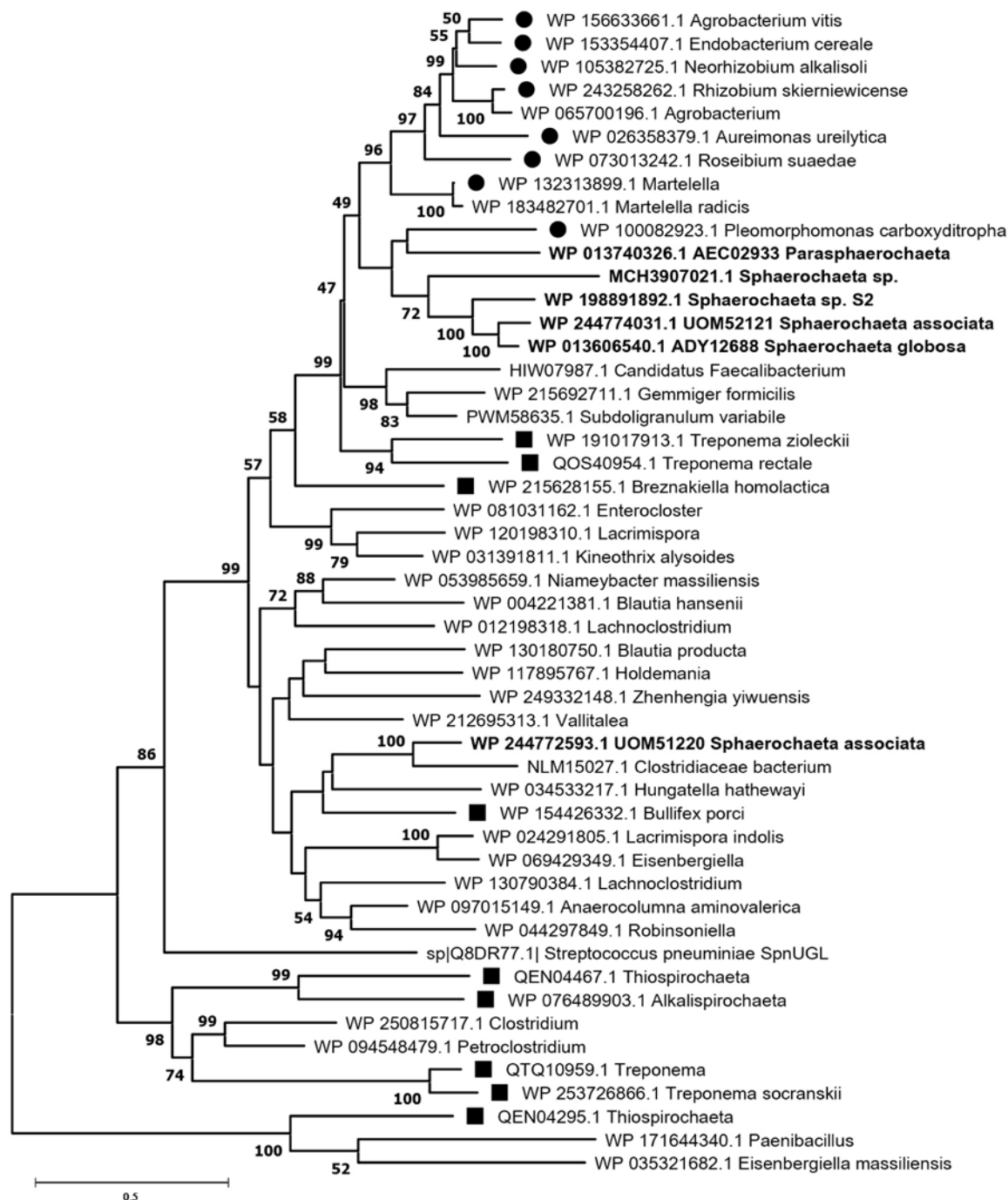


Рис. Филогенетическое дерево белков семейства GH88 гликозил-гидролаз, построенное методом наибольшего правдоподобия (maximum likelihood). ● α -протеобактерии, ■ *Spirochaetales* без *Sphaerochaetaceae*. Жирным шрифтом *Sphaerochaetaceae*, все остальные *Firmicutes*. Белок из *Streptococcus pneumoniae* с номером Q8DR77 в базе UniProt охарактеризован как хондроитин дисахарид-гидролаза

сомы *S. associata* GLS2^T, и оба расположены рядом с генами, кодирующими потенциальные гепариназы семейств PL12 и PL33, а также ABC транспортные системы для сахаров. Анализ филогенетического дерева этих белков показывает, что оба гена были, по-видимому, вначале получены в результате ГПГ от предка *Firmicutes*. Белок UOM51220 находится в большом кластере последовательностей из *Clostridia* (рис.), в то время как гены, кодирующие UOM52121 и гомологи из других известных в настоящее время сферохет, были получены от *Clostridia*, и в дальнейшем произошел ещё один перенос и замещение генами из α -протеобактерий. Так в каскаде генов у *S. associata* GLS2^T, транскрибируемых

в одном направлении и кодирующих UOM52118, 52119, 52120, 52121, 52122 и 52123, белки фланкирующих генов UOM52118, 52122 и 52123 имеют наибольшую гомологию с *Clostridia*, а UOM52119, 52120, 52121 с гомологами из α -протеобактерий. Подобный вариант эволюции мозаичных оперонов в результате ГПГ и замещения генов ортологами из филогенетически далёких таксонов был описан ранее (Omelchenko et al.).

Заключение

Филогенетический анализ белков семейства 88 у *Sphaerochaetaceae* указывает на приобретение генов в результате ГПГ. Сохранение их в геномах сферохет и даже увеличение количества копий этого и других генов белков семейств PL12 и PL33 у *S. associata* способствует расширению метаболических путей бактерии и её адаптации к экологической нише в бинарной культуре с метаносарциной.

Литература

1. Omelchenko et al. Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement *in situ*. Genome Biol 4, R55 (2003). <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1186/gb-2003-4-9-r55>.

Поиск аминокислотных детерминант высокой окислительной активности двухдоменных лакказ методом сайт-направленного мутагенеза

Трубицина Л.И.¹, Абдуматыпов А.В.², Трубицин И.В.¹, Лисов А.В.^{1,3},
Понаморёва О.Н.⁴, Леонтьевский А.А.^{1,3}

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
lyubov_yurevich@mail.ru

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук)

³ Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушино

⁴ Тульский государственный университет, г. Тула

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38367

Бактериальные двухдоменные лакказы – полифенолоксидазы, обладающие низкой субстратной специфичностью и низким окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП). Ранее нами была охарактеризована новая двухдоменная (2д) бактериальная лакказа ScaSL, обладающая средним ОВП и, в связи с этим, повышенной окислительной активностью, по сравнению с другими 2д лакказами. Сравнительный анализ лакказы ScaSL с другими лакказами позволил предположить аминокислотную детерминанту, ответственную за повышение ОВП. Был проведён сайт-направленный мутагенез лакказы ScaSL и получены мутанты 1300His286Ala (M2), 1300His286Trp (M8) и 1300His286Thr (M13).

Цель работы

Целью данной работы стала сравнительная характеристика лакказы дикого типа и мутантных форм. Было установлено, что все лакказы имели типичный спектр поглощения, с максимумом при 590 нм и плечом при 330 нм. Все ферменты окисляли АБТС с максимальной скоростью при pH 4,7, а 2,6-диметоксифенол (ДМФ) – при pH 7,5. Также не было выявлено различий в pH-стабильности исследованных ферментов. Лакказы были более стабильны при pH 9,0. Касательно влияния ингибиторов (азид натрия, фторида натрия, хлорида натрия и ЭДТА натрия) на активность лакказ, ферменты имели схожие показатели остаточной активности. Установлено, что ферменты отличались по кинетическим характеристикам в отношении окисления субстратов АБТС и 2,6-ДМФ. Самой активной была мутантная лакказа M8.

Для сравнительной оценки ОВП лакказ был использован метод хроноамперометрии, основанный на регистрации тока восстановления лакказных электродов в среде без кислорода и в присутствии кислорода при заданном потенциале на электроде. Так, значение потенциала, при котором регистрировался прямой перенос электронов в биоэлектрокаталитических системах на основе лакказ, адсорбированных на поверхности графитовых грифельных электродов с многостенными углеродными нанотрубками, увеличивался в ряду лакказ M2 < M13 < M8: 250 мВ (0,03 мкА); 270 мВ (0,08 мкА); 280 мВ (0,18 мкА); 300 мВ (0,25 мкА), соответственно.

Также был проведен анализ распределения гидрофобных и заряженных групп на поверхности молекул всех исследуемых лакказ. Построены карты распределения электростатического потенциала на поверхности лакказ. Методом молекулярного докинга проанализировано связывание с лакказами следующих веществ: 2,6-ДМФ, АБТС, коронана; на базе полученных энергий связывания рассчитаны константы связывания.

Выводы

Доказано, что аминокислота аланин в позиции 286 у двухдоменной лакказы ScaSL является причиной низкого ОВП фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-5025.2021.1.4.

Изучение свойств новой N-ацетилтрансферазы RimL бактерии *Thermus thermophilus*

Трунилина М.В.^{1,2}, Кудряшов Т.А.¹, Болдаевский И.С.^{1,2}, Соколов А.С.¹, Локтюшов Е.В.¹, Вологжанникова А.А.¹, Шевелева М.П.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН)

² Пушкинский Государственный Естественно-научный Институт, Пушкино,
masha.trunilina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38368

Посттрансляционные модификации являются важной ферментативной реакцией после биосинтеза белка. Ацетилирование – перенос ацетильной группы от Ацетил-КоА на Nα-концевую аминокислотную группу белка или ε-аминогруппу остатков лизина. N-концевое ацетилирование является одной из наиболее распространенных модификаций эукариотических белков (до 90% белков ацетилируется), но значительно реже встречается у бактерий и архей (13–28% белков). N-концевое ацетилирование необходимо для правильного сворачивания белков и пептидов, для правильного функционирования белок-белковых взаимодействий, а также для корректной работы многих белков и ферментов [1]. Кроме того, ацетилирование защищает белки и пептиды от протеолиза, увеличивает время их полужизни в кровотоке, что в последнее время востребовано в биотехнологии и фармакологии.

N-концевое ацетилирование белков катализируют специфические ферменты – N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) [2]. В основном изучение ацетилирования производится на эукариотических ацетилтрансферазах, а для бактериальной информации ограничена. На данный момент наиболее изученными NAT бактерий являются RimL, RimI, RimJ и YiaC [3]. RimL *E. coli* отвечает за превращение прокариотического рибосомного белка из L12 в L7 путем ацетилирования его N-концевой аминокислотной группы. RimL ацетилирует *in vitro* мутантный L12 с заменой Ser на Ala, но с меньшей эффективностью. N-ацетилтрансфераза RimL *E. coli* обеспечивает защиту клетки от антибиотиков. Установлено, что RimL ацетилирует микроцин С (MсС), превращая его в нетоксичное соединение, а также RimL придает клеткам устойчивость к альбомину [4].

RimL *E. coli* используется для N-ацетилирования рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии. Ввиду низкой термостабильности и ограниченной субстратной специфичности RimL *E. coli* актуальным является поиск гомологичных ферментов из экстремофильных организмов. В этой связи цель данной работы заключается в изучении свойств N-ацетилтрансферазы RimL из *T. thermophilus*. В настоящее время установлена трехмерная структура данного фермента и показано, что RimL – гомодимер [5], однако отсутствуют данные о его специфичности и физико-химических свойствах.

Ген TTNA1799, кодирующий предполагаемую N-ацетилтрансферазу RimL (UniProt ID: Q5SHD1), бактерии *T. thermophilus* (ВКМ В-1605) клонирован вектор pET-29. Белок наработан в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен при помощи афинной хроматографии на Ni-NTA до гомогенного состояния. Выход фермента составляет 45 мг с 1 литра культуры. Современными методами физической химии исследованы свойства RimL. Методом динамического светорассеяния установлено, что RimL является гомодимером. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что RimL является термостабильным белком, с серединой теплового перехода 87 ± 1 °C. Методом флюоресценции определены пределы устойчивости фермента к денатурирующим агентам.

Фермент RimL бактерии *T. thermophilus* может быть востребован в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов в условиях повышенных температур.

Литература

1. Varland S., Osberg C., and Arnesen T. «N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects». *Proteomics*, vol. 15, pp. 2385–2401, 2015.
2. Starheim K.K., Gevaert K., and Arnesen T. «Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters». *Trends Biochem Sci*, Mar 7 2012.
3. Parks A.R. and Escalante-Semerena J.C. «Modulation of the bacterial CobB sirtuin deacylase activity by N-terminal acetylation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, pp. 15895–15901, Jul 7 2020.
4. Kazakov T., Kuznedelov K., Semenova E., Mukhamedyarov D., Datsenko K.A., Metlitskaya A., Vondenhoff G.H., Tikhonov A., Agarwal V., Nair S., Van Aerschot A., and Severinov K. «The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C». *J Bacteriology*, vol. 196, pp. 3377–85, 2014.
5. Sakamoto K., Murayama K., Oki K., Iraha F., Kato-Murayama M., Takahashi M., Ohtake K., Kobayashi T., Kuramitsu S., Shirouzu M., and Yokoyama S. «Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography». *Structure*, vol. 17, pp. 335–44, Mar 11 2009.

Активность промоторов оперонов *groESL* метилотрофных бактерий *Methylobacterium oryzae* CBMB20T и *Methylobacterium brachiatum* B0021T

Фирсова Ю.Е.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
yulhenbisti@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38369

Белки теплового шока GroEL и GroES представляют собой одну из наиболее важных групп молекулярных шаперонов, необходимых для правильного сворачивания и рефолдинга многих клеточных белков [1]. Известно, что в условиях стресса количество GroEL в клетках бактерий, в частности *Escherichia coli*, резко увеличивается [2], а нарушение экспрессии гена *groEL* приводит к гибели клеток [3]. Аэробные метилотрофные бактерии, использующие токсичные C₁-соединения (метанол, формальдегид, галометаны и др.) в качестве единственных источников углерода и энергии, широко распространены в окружающей среде. Однако, несмотря на то, что они используют токсичные субстраты и зачастую обитают

в средах с экстремальными условиями (на поверхности растений, в почвах, водах), эта группа бактерий на удивление плохо изучена с точки зрения функций основных клеточных шаперонов.

Целью нашего исследования было изучение роли множественных гомологов шаперонинов GroEL у факультативных метилотрофных бактерий *Methylobacterium oryzae* CBMB20T и *Methylobacterium brachiatum* B0021T, выделенных из разных экологических ниш. CBMB20T – известный симбионт риса, B0021T – метилотроф, изолированный из сточных вод предприятия пищевой промышленности. В результате анализа генома *M. oryzae* CBMB20T нами выявлено два паралога гена *groEL* (MOC_0690 и MOC_4715), генома *M. brachiatum* B0021T – три паралога (LRG69_02710, LRG69_29215 и LRG69_29625), характеризующихся различным уровнем сходства кодируемых белков GroEL между собой (44–91%). За исключением *groEL3* (LRG69_29625) *M. brachiatum* B0021T, все паралоги гена *groEL* входили в состав бицистронных оперонов *groESL1* и *groESL2*. На первом этапе исследований нами были изучены промоторные регионы данных оперонов. Для этого предполагаемые промоторные последовательности (277–671 п.н.) были клонированы в ранее сконструированную нами беспромоторную плазмиду pCMgfp [4], несущую ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp* из вектора pGreenTIR. Во всех случаях клонированная последовательность полностью включала участок между стартовым кодоном гена *groES* и соседним вышерасположенным геном с захватом небольших частей этих генов. Полученные репортерные плазмиды, несущие *gfp* под контролем предполагаемых нативных промоторов оперонов *groESL*, были перенесены в штаммы *M. oryzae* и *M. brachiatum* методом двуродительского скрещивания с использованием в качестве донора *E. coli* S17-1. Измерение флуоресценции в клетках репортерных штаммов проведено на флуориметре FLUOstar OPTIMA (“BMG Labtech”, Германия), при длинах волн: возбуждения – 485 нм, эмиссии – 510 нм. Флуоресценция *gfp* была детектирована в клетках 4 изученных репортерных штаммов, выращенных на метаноле (рис. 1). В случае *M. brachiatum* промоторные последовательности оперонов *groESL1* и *groESL2* ($P_{groESL1}$ и $P_{groESL2}$, соответственно) обеспечивали близкие уровни флуоресценции *gfp*. Это указывает на то, что у *M. brachiatum* оба оперона *groESL* в равной степени активны и, возможно, взаимозаменяемы. Напротив, у *M. oryzae* $P_{groESL1}$ обусловил в 9,6 раза более высокий уровень флуоресценции по сравнению с $P_{groESL2}$. Следовательно, у *M. oryzae* оперон *groESL1* существенно более активен, чем *groESL2*. Подобное наблюдается у метилотрофа *Methylorubrum extorquens* DM4, когда «housekeeping» оперон *groESL1* активно экспрессируется и необходим для жизнеспособности клеток, тогда как вторая пара генов *groESL2* с низким уровнем экспрессии участвует в адаптации бактерий к некоторым стрессам (кислотному, солевому), обусловленным использованием токсичного субстрата – дихлорметана [4].

Транслированная аминокислотная последовательность GroEL3 *M. brachiatum* B0021T характеризуется низким уровнем сходства с другими шаперонинами GroEL данного штамма (44%). Кодирующий ее ген *groEL3* находится, предположительно, в составе несвойственного для метиловых бактерий кластера генов метанмонооксигеназы (ММО), катализирующей окисление метана у метанотрофов. Измерен уровень флуоресценции *gfp* под контролем промоторной последовательности P_{mmo} (618 п.н.), расположенной выше стартового кодона первого гена предполагаемого *mmo*-оперона, в клетках, выращенных на метаноле в присутствии метана. Активность P_{mmo} оказалась на порядок более низкой по сравнению с $P_{groESL1}$ и $P_{groESL2}$, что вряд ли может служить доказательством функциональности данного оперона. Пред-

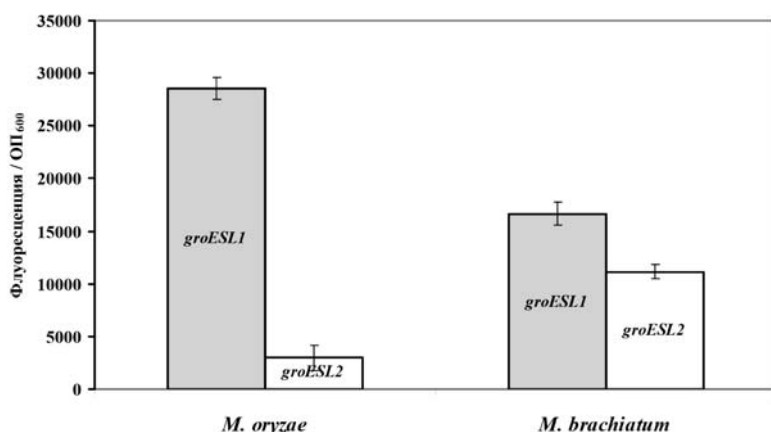


Рис. 1 Активность промоторов оперонов *groESL* в клетках *M. oryzae* CBMB20T и *M. brachiatum* B0021T, выращенных на среде «ММ» с метанолом. *groESL1* и *groESL2* обозначены опероны MOC_0691-0690 и MOC_4714-4715 в геноме CBMB20T; а также LRG69_02715-02710 и LRG69_29220-29215 в геноме B0021T, соответственно

положительно, *groEL3* был получен данным штаммом случайно в результате горизонтального переноса *mto*-генов от неизвестного метанотрофа.

Таким образом, мы впервые изучили активность промоторных регионов оперонов *groESL* в штаммах *M. oryzae* и *M. brachiatum* и подтвердили их функциональность. В дальнейшем для более детального изучения функций и регуляции экспрессии шаперонинов GroEL планируется получить нокаут-мутанты по отдельным паралогам генов *groEL* методом сайт-специфической рекомбинации.

Литература

1. Mizobata T., Kawata Y. The versatile mutational «repertoire» of *Escherichia coli* GroEL, a multidomain chaperonin nanomachine // Biophys. Rev. 2018. V. 10. P. 631–640.
2. Kumar C.M.S., Mande S.C., Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria – novel functions and non-canonical behaviors // Cell Stress and Chaperones. 2015. V. 20. P. 555–574.
3. Walter S. Structure and function of the GroEL chaperone // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 1589–1597.
4. Firsova Y.E., Torgonskaya M.L. Different roles of two *groEL* homologues in methylotrophic utiliser of dichloromethane *Methylorubrum extorquens* DM4 // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 101–116.

Рекомбинантная холестериноксидаза из *Nocardioides simplex*

Фокина В.В., Карпов М.В., Комеров В.В., Брагин Е.Ю., Эпиктетов Д.О.,
Шутов А.А., Свиридов А.В., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН),
2vvfokina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38370

Ферменты, известные как «холестериноксидазы» (ХО, ЕС 1.1.3.6) и превращающие холестерин (5-холестен-3 β -ол) в 4-холестен-3-он, не только играют значимую роль в метаболизме продуцирующих их бактерий, но также имеют важнейшее практическое значение, находя применение в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве, химии и биотехнологии. ХО представляет собой ФАД-содержащий белок, проявляющий двойственную активность: оксидоредуктазную и изомеразную; при этом сначала происходит окисление 3 β -гидрокси-группы до 3-кето-группы, а затем изомеризация двойной связи $\Delta^{5(6)}$ в $\Delta^{4(5)}$ в системе колец стероидного ядра. Образовавшийся при этом восстановленный ФАД реагирует с молекулой кислорода с образованием перекиси водорода (рис. 1).

Холестериноксидазы известны с середины XX века, однако лишь относительно недавно были обнаружены и изучены высокоактивные растворимые формы ХО, перспективные для прикладного применения и продуцируемые, преимущественно, актиномицетами. Поиск новых высокоактивных и стабильных ХО необходим для успешного развития таких важнейших сфер, как экспресс-анализ холестерина в биологических жидкостях, создание безопасных инсектицидов, а также терапия злокачественных опухолей.

Ранее было выявлено наличие у актинобактерии *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д способности к эффективной трансформации холестерина в холестенон. В геноме *N. simplex* выявлен ген ХО, в то время как других генов, продукты которых могут быть ответственны за осуществление модификации 3-гидрокси-5-ен- в 3-кето-4-ен-группировку, например, 3-гидроксистероиддегидрогеназы, в геноме *N. simplex* не выявлено.

В рамках данной работы нами была впервые получена и охарактеризована рекомбинантная зрелая форма ХО *N. simplex*.

Зрелая форма ХО *N. simplex* (55,6 кДа) с 6xHis-меткой была получена путём экспрессии в клетках *Escherichia coli* соответствующей нуклеотидной последовательности (рис. 2). Выделение и очистку рекомбинантной ХО *N. simplex* (ХО_{Ns}) проводили с помощью аффинной хроматографии. Фермент про-

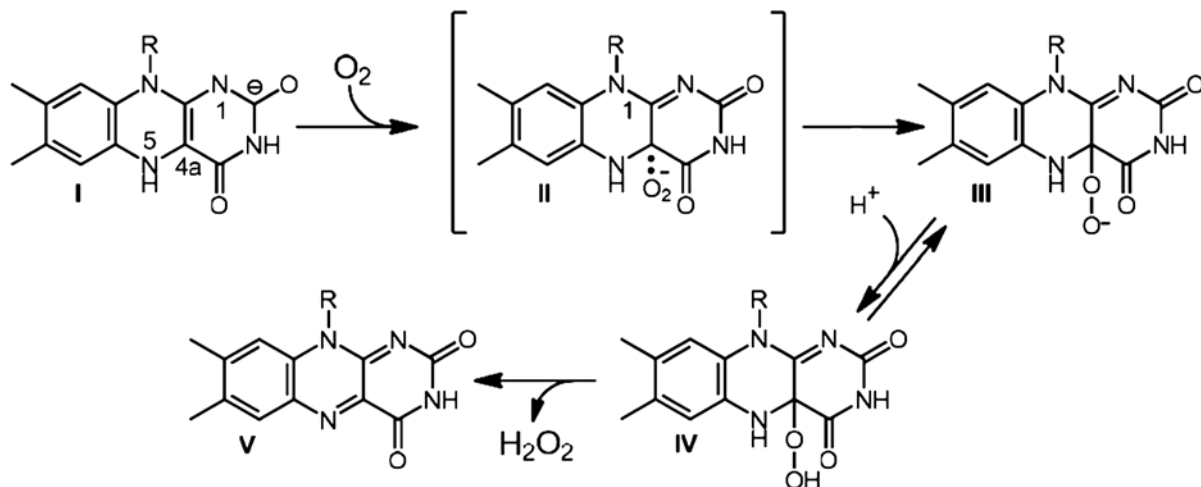


Рис. 1. Реакция восстановленного ФАД (I) с кислородом. Из образующейся радикальной пары (II) формируется C(4a)-гидропероксид анион (III), который с поглощением протона образует нейтральный C(4a)-гидропероксид (IV). Гидропероксид флавина (IV) подвергается гетеролитическому распаду с выделением перекиси водорода и окисленного ФАД (V)

являл активность по отношению к холестерину, холестеранолу, фитостерину, прегненолону и дегидроэпиандростерону. Активность ХО зависела от структуры и длины алифатической боковой цепи при С17 стероида и была ниже для прегненолона и дегидроэпиандростерона (табл. 2). ХО_{NS} проявляла активность в диапазоне рН 5,25–6,5 с оптимумом рН 6,0. Анализ кинетических характеристик и тестов на стабильность при хранении показал, что показатели ХО_{NS} сравнимы или превосходят таковые для коммерческой ХО из *Streptomyces hygroscopicus* (ХО_{Sh}). При определении активности ХО_{NS} методами спектрофотометрии, ВЭЖХ и ТСХ было обнаружено, что выбор подходящей реакционной среды

крайне важен для получения адекватных результатов. Реакционная среда, основанная на солиubilизации стероидов в присутствии холат натрия и Triton X-100, позволила фиксировать конверсию холестерина в холест-4-ен-3-он методом ТСХ, но препятствовала реакции окисления 2,2-азино-диэтилбензтиазолинсульфоната (АБТС) в сопряженной реакции с пероксидазой хрена.

Напротив, использование среды с метилированным циклодекстрином обеспечило применение экспресс-метода спектрофотометрического измерения активности ХО_{NS}, однако конверсия стероидов в таких реакционных смесях оказалась существенно ниже ожидаемой при использовании методов ТСХ и ВЭЖХ. Корректность применяемых подходов была подтверждена экспериментами с коммерческой ХО_{Sh} с получением характеристик, близких к заявленным производителем. Кинетические характеристики ХО_{NS} в отношении холестерина – V_{max} и k_{cat} – оказались близки к таковым для ХО_{Sh}. Однако значение K_M для ХО_{NS} было выше в 2 раза по сравнению с K_M для ХО_{Sh} и, соответственно, каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) у ХО_{NS} была вдвое ниже. Спектрофотометрические измерения активности двух ферментов при высоких концентрациях холестерина (≥ 1 мМ) позволили выявить эффект, схожий с субстратным ингибированием. Значения величины K_M , составившие $6.1 \cdot 10^{-4} \pm 0.05 \cdot 10^{-4}$ М для ХО_{NS} и $3.1 \cdot 10^{-4} \pm 0.014 \cdot 10^{-4}$ М для коммерческой ХО_{Sh}, полученные нами при использовании циклодекстриновой среды, сравнимы с данными для ХО *Streptomyces* sp. (K_M $2.17 \cdot 10^{-4}$ М) в среде с холатом натрия и Triton X-100.

Результаты расширяют знания о микробных ХО и свидетельствуют о том, что ХО из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д перспективна для дальнейшего практического применения.

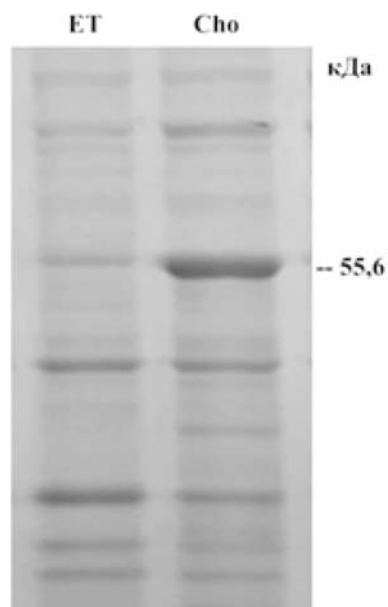
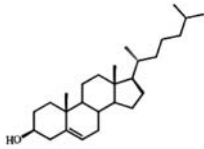
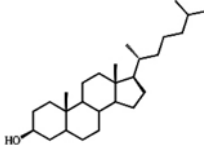
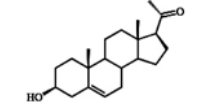
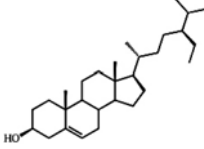
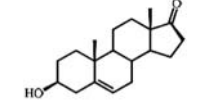


Рис. 2. Электрофорез в 10% ДСН-ПААГ клеточных лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21 (DE3), содержащих вектор рЕТ28а (ЕТ) и плазмиду рЕТCho (Cho). Индукция ИПТГ при 25 °С в течение 6 часов. Указана молекулярная масса для зрелой формы ХО, маркированной 6xHis

Активность XO_{Ns} в отношении стероидов с различной конфигурацией боковой цепи при концентрации стероидного субстрата 0.5 мМ, pH 7.0, 30 °С

Субстрат	Химическая структура	Относительная активность рекомбинантной XO_{Ns} , %
Холестерин		100
5 α -Холестанол		59,57 \pm 3,68
Прегненолон		41,41 \pm 2,81
Фитостерин		39,3 \pm 3,86
ДГЭА		9,12 \pm 0,29

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

Скрининг представителей рода *Gordonia* по способности к деструкции углеводов

Французова Е.Э., Делеган Я.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
katkaty235@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38371

Существует ряд микроорганизмов, способных к деградации широкого спектра нефтепродуктов, используя углеводороды в качестве источников углерода и энергии. Так, актинобактерии рода *Gordonia* способны утилизировать как алифатические (алканы), так и ароматические углеводороды. Такой огромный деградационный потенциал делает их перспективными для использования в биотехнологии с целью очистки окружающей среды. В ходе данной работы изучены штаммы-деструкторы органических поллютантов, а также проверена способность штаммов утилизировать алканы, ароматические соединения и ПАУ.

Выполнено секвенирование и анализ геномов 7 штаммов рода *Gordonia*: 96, 112, 132, 133, 134, 142, 144. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Полученные данные секвенирования

№	Штамм	Размер генома, п.н.	G+C состав, %
1	96	4,923,799	67.48
2	112	5,282,542	67.28
3	132	5,000,930	67.46
4	133	5,014,428	67.38
5	134	5,071,708	67.55
6	142	5,040,772	67.50
7	144	5,789,100	67.29

Принадлежность к виду определена (табл. 2) с помощью ANI (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) и DDH (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>), видовой порог для которых составляет 95–96% и 70% соответственно (Kim M. et al., 2014).

Таблица 2

Видовая идентификация штаммов

Штамм	<i>Gordonia alkanivorans</i> NBRC 16433		<i>Gordonia amicalis</i> NBRC 100051		<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247		<i>Gordonia rubripertincta</i> NBRC 101908		<i>Gordonia terrae</i> NBRC 100016	
	ANI	DDH	ANI	DDH	ANI	DDH	ANI	DDH	ANI	DDH
96	98.45	89.70	88.40	73.00	77.38	22.60	92.46	75.70	80.78	36.90
112	92.32	70.80	87.92	64.40	77.49	22.20	99,98	99.30	80.82	34.80
132	98.42	88.80	88.45	73.20	77.37	22.80	92.54	77.90	80.89	37.00
133	98.37	88.50	88.47	72.90	77.40	22.70	92.60	77.60	80.93	36.90
134	98.23	87.60	88.18	70.80	77.43	22.40	92.13	76.30	80.62	36.80
142	98.23	91.00	88.18	70.70	77.32	22.50	92.45	75.60	80.84	36.90
144	98.51	86.40	88.40	67.80	77.38	21.30	92.86	73.80	80.87	32.90

Выяснено, что штамм 112 относится к виду *Gordonia rubripertincta*, а другие 6 – к *Gordonia alkanivorans*.

Известно, что деградация алканов гордониями осуществляется при участии группы ферментов – алкангидроксилаз семейства AlkB или цитохрома P450 (семейство CYP153) (Nie Y. et al., 2014). Одновременное присутствие нескольких типов алкангидроксилаз позволяет бактериям потреблять большее разнообразие субстратов. Соответственно, выполнен поиск структур, ответственных за утилизацию алканов исследуемыми штаммами. Выявлено, что гены алкангидроксилаз семейства AlkB отсутствуют в геномах всех образцов, однако, имеется по несколько копий цитохрома P450 (табл. 3).

Таблица 3

Алкангидроксилазы исследуемых штаммов

№	Штамм	AlkB	CYP153
1	96	–	2
2	112	–	3
3	132	–	3
4	133	–	2
5	134	–	2
6	142	–	2
7	144	–	3

Таким образом, деструкция алканов изучаемыми штаммами осуществляется при участии алкангидроксилаз семейства CYP153.

С помощью сервиса KEGG (<https://www.kegg.jp/>) у исследуемых штаммов обнаружены гены в категории биодegradация и метаболизм ксенобиотиков. Выявлены гены дегградации галогеналканов, галогеналкенов, а также полные пути дегградации моноциклических соединений (бензоата, катехола и других производных бензола). В подкатегории дегградации нафталина обнаружены гены, участвующие в разложении 1-метилнафталина.

Таким образом, была изучена способность к деструкции углеводов разных классов: алканы, ароматические, моно- и полициклические соединения. Функциональность ряда генов подтверждена способностью к росту на соответствующих углеводородах.

Работа выполнена при поддержке РФФ 22-74-10082.

Литература

1. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64. P. 346–351.
2. Nie Y., Chi C.Q., Fang H. et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // Sci Rep, 2014, 15. №. 4. 11 p.

Новые аммиак-лиазы ароматических аминокислот из *Rhodococcus opacus* 1CP: филогенетический анализ и молекулярное моделирование

Фролов Д.С.¹, Черных А.М.², Коломыцева М.П.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
ozonizer.ozonizer@gmail.com; mpkolomytseva@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38372

Аммиак-лиазы ароматических аминокислот (AAAL) – перспективные для биотехнологического применения ферменты, катализирующие удаление α -аминогруппы соответствующих *L*-аминокислот с образованием *транс*-арилакрилатов (рис. 1). Семейство AAAL в зависимости от катализируемой реакции подразделяют на гистидин-аммиак-лиазы (HAL, EC 4.3.1.3), тирозин-аммиак-лиазы (TAL, EC 4.3.1.23), фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL, EC 4.3.1.24), фенилаланин/тирозин-аммиак-лиазы (PTAL, EC 4.3.1.25) [1, 2].

С помощью обратной катализируемой реакции возможен селективный синтез как природных *L*-аминокислот для пищевой промышленности, так и различных замещённых, гетероциклических и конденсированных непротеиногенных *L*-аминокислот для химического синтеза, а также очистка рацематов с целью получения *D*-аминокислот [3]. Некоторые PAL проявляют широкую субстратную специфичность и могут действовать на неприродные аминокислоты. Реакция дезаминирования, катализируемая аммиак-лиазами, инициирует пути синтеза многих биологически-активных вторичных метаболитов растений: флавоноидов, стильбеноидов, лигнанов и др. Гетерологическая экспрессия данных ферментов в тандеме с другими ферментами позволяет воссоздать данные биохимические пути в штаммах микроорганизмов, пригодных для продукции целевого соединения в промышленных масштабах [4].

Бактериальные AAAL в настоящее время являются малоизученными ферментами, а AAAL грамположительных бактерий рода *Rhodococcus* не исследованы вовсе. В настоящей работе с помощью алгоритма BLAST был проведен поиск генов, кодирующих AAAL в геноме бактерии *R. opacus* 1CP. Было обнаружено два потенциальных гена, один из которых кодирует белок, более похожий на TAL из *Rhodobacter*

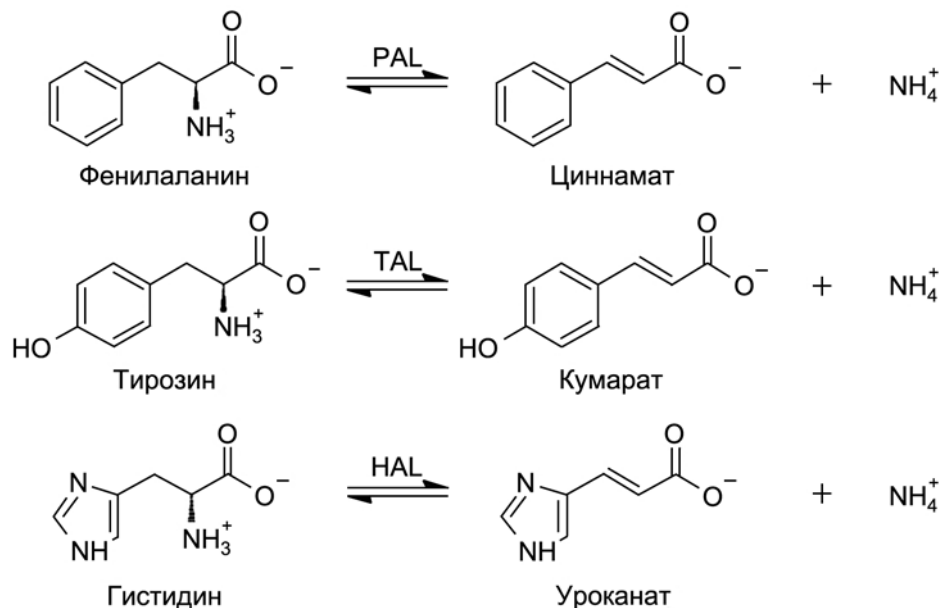
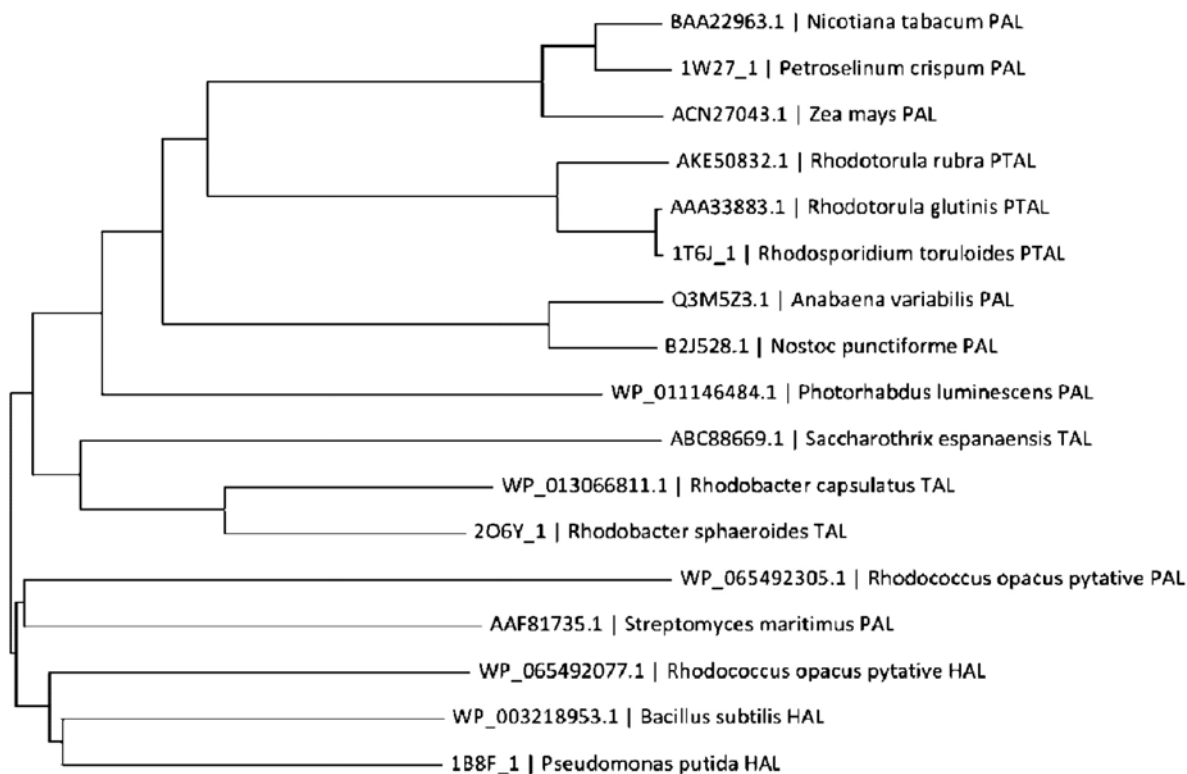


Рис. 1. Реакции, катализируемые аммиак-лиазами ароматических аминокислот



sphaeroides (идентичность 30,34% при покрытии 95%), а другой – похожий на HAL из *Pseudomonas putida* (идентичность 42,30% при покрытии 92%).

Был проведен филогенетический анализ (методом Neighbor joining) аминокислотных последовательностей AAAL, найденных у *R. opacus* ICP, и биохимически охарактеризованных AAAL. В результате было показано, что грибные и растительные AAAL формируют хорошо кластеризующиеся монофилетические группы. Выделить бактериальные филумы таким образом не удаётся (по крайней мере при такой небольшой выборке белков): *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* оказываются «перетасованы» между собой. Тем не менее, возможно выделить группы по субстратной специфичности. Наиболее да-

леко отстоящей оказывается группа HAL, что позволяет предположить их более раннее эволюционное отделение от предков PAL и TAL, что согласуется с опубликованными ранее данными [5]. Исключением является уникальные по последовательности PAL из *Streptomyces maritimus* и предполагаемая PAL из *R. opacus*, которые оказываются филогенетически ближе к HAL, чем к остальным PAL или TAL.

Для более детального анализа было осуществлено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей AAAL из *R. opacus* 1CP и охарактеризованных AAAL. Показано, что большинство аминокислотных остатков, предположительно формирующих активный центр AAAL *R. opacus* 1CP, совпадают с таковыми у известных AAAL. Однако найдены аминокислотные замены, которые потенциально могут повлиять на субстратную специфичность исследуемых ферментов и изменить границы их прикладного применения.

С помощью программного пакета Modeller было осуществлено гомологическое моделирование структуры предполагаемых ферментов с использованием ближайших структурных гомологов в качестве темплейтов: для PAL *R. opacus* 1CP использовали структуры TAL из *Rhodobacter sphaeroides* (PDB: 2O6Y), HAL из *Pseudomonas putida* (PDB: 1GKJ) и HAL из *Thermoplasma acidophilum* (PDB: 7TQR); для HAL *R. opacus* 1CP – структуры HAL из *Pseudomonas putida* (PDB: 1GKJ), HAL из *Thermoplasma acidophilum* (PDB: 7TQR) и ТАМ из *Streptomyces globisporus* (PDB: 2OHY). После оптимизации энергии DOPE-score рассчитанных структур составил $-54276,855$ и $-58008,219$ для PAL и HAL, соответственно. Качество структур позволяет проводить моделирование молекулярной динамики, молекулярный докинг и мутагенез *in silico*.

Литература

1. Jendresen C.B. et al. Highly Active and Specific Tyrosine Ammonia-Lyases from Diverse Origins Enable Enhanced Production of Aromatic Compounds in Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. 2015. Vol. 81, № 13. P. 4458–4476.
2. Parmeggiani F., Weise N.J., Ahmed S.T., Turner N.J. Synthetic and therapeutic applications of ammonia-lyases and aminomutases // Chem. Rev. 2018. Vol. 118. P. 73–118.
3. Poppe L. et al. Preparation of Unnatural Amino Acids with Ammonia-Lyases and 2,3-Aminomutases // Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols / ed. Pollegioni L., Servi S. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. P. 3–19.
4. Marienhagen J., Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products // J. Biotechnol. 2013. Vol. 163, № 2. P. 166–178.
5. Peng F. et al. Origin and Evolution of Enzymes with MIO Prosthetic Group: Microbial Coevolution After the Mass Extinction Event // Front. Genet. 2022. Vol. 13. P. 851738.

Фотобиомодуляция микробиоты кишечника человека *in vitro* с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения

Храмов Р.Н.¹, Заломова Л.В.², Фесенко Е.Е.(мл.)²

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, khramov30@mail.ru

² Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38373

Предпосылки и цели

Фотобиомодуляция (ФБМ) человека применяется достаточно широко для облегчения боли, заживления ран и многого другого и для этого используется свет на различных длинах волн, но нет единого мнения об оптимальных длинах волн и дозах облучения. ФБМ – терапия работает через предполагаемые, зависящие от длины волны механизмы, включая прямую стимуляцию митохондриального дыха-

ния и/или активацию трансмембранных сигнальных каналов путем изменения активности воды. Достаточно молодым направлением ФБМ является внешнее облучение микробиоты кишечника (МК), которой даже отводят роль как важнейшему органу организма (1). Для экзогенного воздействия на экосистему МК через поверхность живота целесообразно использовать свет в диапазоне окна прозрачности биологических тканей (600–1500 нм), что было обосновано теоретически (2). Мы впервые попытались оценить эффективность прямой ФБМ в насколько возможно выделить и культивировать полной экосистеме микроорганизмов МК *in vitro*, выделенной из образцов стула человека. При этом сравнить эффективность ФБМ для светодиодного излучения в двух диапазонах длин волн: в красном и ближнем инфракрасном (БИК) с максимумами 660 нм и 940 нм соответственно. Мы стремились получить больше информации об интегральных параметрах всей выделенной экосистемы МК, а также одного из важнейших МК штаммов – бифидобактерий (*Bifidobacterium breve*), по показателям выживаемости клеток после повреждающей крионагрузки и по влиянию на кривые роста при предварительной ФБМ в этих диапазонах при разных дозах.

Дизайн исследования, материалы и методы

Кривые роста были измерены по оптической плотности культивируемых клеток МК в анаэробных условиях, подвергнутых предварительному воздействию 660 или 940 нм с различными дозами от светодиодных источников. Устойчивость к повреждениям от нагрузочного теста криоконсервации микроорганизмов оценивали с помощью анализа соотношения количества живых и мертвых клеток.

Результаты

Микроорганизмы МК по-разному реагировали на воздействие при 660 нм (красный) и 940 нм (БИК). Максимальный достоверный прирост выживаемости МК после нагрузочного теста криоконсервации был более чем в три раза больше при 940 нм по сравнению с 660 нм (соответственно 23 и 7%) в диапазоне доз от 10 до 600 J/m². Аналогичная картина наблюдалась и для микроорганизмов *Bifidobacterium breve*: при 940 нм прирост выживаемости достигал 10%, а при 660 нм не наблюдалось достоверных изменений в диапазоне 10–160 J/m². ФБМ 660 нм не оказывала достоверного влияния на кривые роста *Bifidobacterium breve*, в то время как ФБМ 940 нм вызывала на 4 и 6 часе культивации достоверные изменения кривых роста: как подавление на 3,5%, так и увеличение на 9% по сравнению с контрольными, но только лишь на культурах после криоконсервации. Также только на культуре МК после криоконсервации излучение с 940 нм вызывало достоверные изменения в широком диапазоне доз как при очень низкой дозе 1 J/m² так и при достаточно больших дозах до 67800 J/m², на которых эффекты были всегда позитивными и носили нетепловой характер.

Заключение

Насколько нам известно, это первая демонстрация различной чувствительности бактерий МК *in vitro* в ответ на ФБМ *in vitro* с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения. Мы также обнаружили специфические для клеточного типа различия в ответе на ФБМ воздействие *in vitro* с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения. Эти результаты подтверждают, что различные пути ответа задействованы после воздействия светодиодного излучения 660 и 940 нм и, что ближний инфракрасный свет 940 нм может вызывать более значимое позитивное воздействие на микроорганизмы МК. То, что эффекты ФБМ больше выявляются либо при повреждениях или после повреждений, вызываемых процедурой криоконсервации, можно предполагать, что ФБМ может быть особенно эффективна при различных заболеваниях или стрессорных воздействиях, приводящих к дисбиозу МК человека.

Литература

1. Bicknell B., Laakso E.L., Liebert A., Kiat H. Modifying the Microbiome as a Potential Mechanism of Photobiomodulation: A Case Report. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2022 Feb;40(2):88-97. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1089/photob.2021.0057. Epub 2021 Dec 28. PMID: 34962422.
2. Храмов Р.Н. На пути к разработке экзогенной фотобиомодуляции микробиоты кишечника человека, В книге: Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика». Под ред. чл.-корр. РАН Иваницкого Г.Р. 2021. Издательство: Синхробук (SynchrobookTM), С. 57–59.

Универсальный алгоритм молекулярно-генетического анализа для оценки токсичности веществ и природных сред

Царева М.С., Олькова А.С., Козвонин В.А.

Вятский государственный университет, г. Киров, usr08617@vyatsu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38374

Методы молекулярной биологии являются фронтальными и высокоактуальными во многих сферах науки и технических разработок: от систематики живых организмов до создания сверхновых лекарственных препаратов. Одним из прикладных направлений использования методов молекулярной биологии является экологическая токсикология. Молекулярно-генетические анализы, в частности определение активности (экспрессии) генов, отвечающих за метаболизм токсичных веществ у живых организмов, являются перспективной основой для изучения механизмов токсического процесса, возникающих молекулярных эффектов и их дальнейшей связи с физиологическими и морфологическими эффектами у различных видов живых организмов.

Общая схема биотестирования с последующим молекулярно-генетическим исследованием биопроб включает следующие этапы:

1. Экспозиция модельной популяции (выборки) тест-организмов в исследуемой среде, которой может являться как компонент окружающей среды, так и искусственно смоделированная среда.

2. Извлечение экспонированных тест-организмов из тестируемой среды.

3. Выделение суммарной РНК из биомассы. Может проводиться с использованием стандартных наборов, например, RNA Solo (Набор RNA Solo..., 2022) для выделения суммарной РНК на колонках из тканей животных, бактерий, дрожжей. RNA Solo позволяет осуществить лизис клеток, ингибирование РНКаз для сохранности РНК, очищение РНК от ДНК с помощью ДНКазы, сорбцию и очистку РНК на микроцентрифужной колонке, элюцию РНК в водный раствор. Желательно соблюдение критериев целостности препарата, полного удаления примеси геномной ДНК с помощью ДНКазы, отсутствие этапа органической фенол-хлороформной экстракции, а так же минимальный риск контаминации рабочего пространства. Рекомендуется проводить выделение из живых или свежих объектов. Допустимо использовать свежемороженый в жидком азоте биоматериал или сохраненный с помощью консерванта (например, IntactRNA (Фиксатор IntactRNA..., 2022)). IntactRNA – нетоксичный водный фиксатор, предназначенный для быстрой стабилизации клеточной РНК в тканях и клеточных культурах. Фиксатор быстро проникает в ткани и клетки и защищает РНК от деградации даже при комнатной температуре. Это позволяет транспортировать, пересылать и хранить зафиксированные образцы без замораживания до 7 дней. Применение IntactRNA позволяет быстро зафиксировать большое количество образцов не прибегая к ресурсоемким процедурам быстрого выделения РНК или замораживания жидким азотом. Суммарный препарат РНК, выделенный из зафиксированных фрагментов ткани, сохраняет качественный и количественный состав и может затем быть использован в любых молекулярно-биологических приложениях. Чистота выделенной суммарной РНК контролируется по спектрофотометрическим показателям.

4. Проведение реакции обратной транскрипции возможно с применением обратной транскриптазы MMLV и набора «MMLV RT kit» (MMLV RT kit..., 2022). Позволяет осуществить синтез первой цепи кДНК с одноцепочечной РНК-матрицы. Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. coli*, экспрессирующего ген MMLV ревертазы дикого типа, обладает слабой активностью РНКазы H, и позволяет синтезировать кДНК длиной до 5 т.п.о. MMLV ревертаза идет вместе со специально подобранным 5X реакционным буфером, а также с буфером для разведения, который позволяет подобрать оптимальные условия для реакции обратной транскрипции, так же в набор входит смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, стерильную воду, олиго(dT) и случайный декануклеотидный праймеры, что позволяет использовать его для синтеза кДНК с различных РНК-матриц (как полиА+, так и неполиаденилированных). Минимальное стартовое количество РНК для синтеза первой цепи кДНК составляет 100 нг тотальной или полиА+ РНК.

5. Полученная кДНК используется для проведения полимеразной цепной реакции в нескольких повторностях для получения статистически достоверных результатов. На данном этапе возможно применение смеси для ПЦР 5X qPCRMix-HS SYBR (Реакционная смесь..., 2022), включающей HS Taq ДНК полимеразу, краситель SYBR Green I, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} , реакционный буфер. Для постановки ПЦР в смесь требуется добавить праймеры, матрицу ДНК и воду. Праймеры синтезируются к генам, кодирующим интересующие нас детоксицирующие белки. Это могут быть белки теплового шока, металлотионеина (А и В), каталазы и ферритина, а также иные. В качестве нормализующего контрольного показателя при обработке результатов исследований методом относительной квантификации (метод дельта Ct) могут использоваться показатели экспрессии генов «домашнего хозяйства» – например рибосомальных или актина и подобных эндогенных референс-генов (Schmittgen, Livak, 2008). Под относительной экспрессией понимается отношение: $E(Ct \text{ референс-ген})/E(Ct \text{ ген интереса})$, где E – эффективность реакции, Ct – пороговый цикл.

Таким образом, биотесты, основанные на молекулярно-генетическом анализе биомассы тест-организмов, обладают следующими преимуществами и возможностями:

- использование микроколичеств биомассы тест-организмов, что крайне важно при работе с микроорганизмами;
- оценка предлетальных эффектов на молекулярном уровне организации жизни;
- определение широкого набора экспрессированных генов, информация о которых раскрывает молекулярные механизмы токсического действия веществ и их детоксикации.

Литература

1. Набор RNA Solo для выделения суммарной РНК на колонках из клеток и мягких тканей человека и животных, бактерий, дрожжей [Электронный ресурс]. – URL: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/RNASolo.pdf> (дата обращения: 20.10.2022)
2. Фиксатор IntactRNA для стабилизации РНК в биологических образцах [Электронный ресурс]. – URL: <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/intactRNA.pdf> (дата обращения: 20.10.2022)
3. MMLV RT kit. Набор реактивов для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице. [Электронный ресурс]. – URL: https://evrogen.ru/kit-user-manuals/MMLV_SK021.pdf (дата обращения: 20.10.2022)
4. Реакционная смесь 5X qPCRMix-HS SYBR для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green [Электронный ресурс]. – URL: https://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRMix-HS-SYBR_PK147.pdf (дата обращения: 20.10.2022)
5. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008. 3(6):1101-8. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1038/nprot.2008.73. PMID: 18546601.

Штамм-нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* F2-2, обладающий фитостимулирующими свойствами

Чайка Н.Я.¹, Захарченко Н.С.³, Анохина Т.О.³, Позднякова-Филатова Т.Ю.³,
Шутов А.А.³, Делеган Я.А.², Звонарев А.Н.³, Филонов А.Е.^{1,3}

¹Тулский государственный университет, Тула

²Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

³ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
filonov.andrey@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38375

Актинобактерии рода *Rhodococcus* являются типичными представителями почвенных микробиоценозов; особенно высока их численность в биотопах у нефтяных месторождений, что свидетельствует об их участии в процессах естественной биодegradации углеводородов нефти (Ившина с соавт. 2021).

Обладая широкими катаболическими возможностями и разнообразными ферментными системами благодаря мозаичности и лабильности генома, родококки могут деградировать различные органические соединения, включая многие токсиканты. Эти особенности в сочетании со способностью выживать в неблагоприятных условиях среды делают представителей рода *Rhodococcus* перспективными при разработке биопрепаратов для очистки загрязненных нефтепродуктами объектов окружающей среды. В настоящее время катаболический потенциал углеводородокисляющих родококков изучен достаточно хорошо, однако, очень мало известно о фитостимулирующих свойствах и антимикробной активности родококков-нефтедеструкторов.

Штамм-нефтедеструктор *R. qingshengii* F2-2 выделен из почвы (Puntus et al., 2019) нефтяного месторождения Фестивальное (ЯНАО). Способен расти в среде с гексадеканом, додеканом, ундеканом и деканом в качестве единственных источников углерода в широком температурном диапазоне (от 4 до 40 °С). При росте в среде с гексадеканом эффективно снижает поверхностное натяжение до 30 мН/м за счёт продукции биосурфактантов трегалолипидной природы.

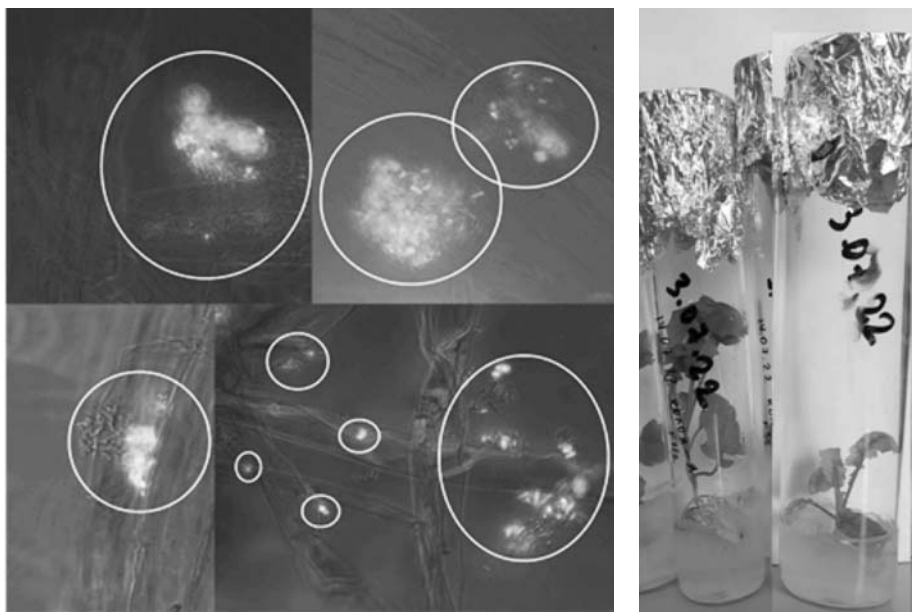
При поиске генных кластеров продукции вторичных метаболитов в геноме штамма *Rhodococcus qingshengii* F2-2 нами обнаружен кластер генов биосинтеза феназинов на плазмиде pLP156, которые являются антибиотиками, подавляющими фитопатогенные грибы. Изучение антимикробной активности штамма F2-2 в отношении фитопатогенных микромицетов и бактерий показало, что штамм обладает антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам видов *Fusarium graminearum* и *Gaeumannomyces graminis var tritici* (табл.).

При экстрагировании феназинов штамма *R. qingshengii* F2-2 в качестве контроля был выбран штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, синтезирующий соединения феназинового ряда, а также стимулирующий рост растений (Сиунова с соавт, 2017). Тонкослойная хроматография экстрактов культуральной жидкости обоих штаммов выявила спектр схожих интенсивно окрашенных пятен, что свидетельствует о наличии феназиновых соединений в культуральной жидкости штамма F2-2.

Экстракты культуральной жидкости обоих штаммов были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На ВЭЖХ-профиле пробы BS1393 обнаружен пик, соответствующий по времени удержания феназинкарбоновой кислоте. Несмотря на то, что феназинкарбоновая кислота в экстракте культуральной жидкости штамма *R. qingshengii* F2-2 не была обнаружена, можно предположить наличие других феназиновых соединений, продуцируемых этим штаммом.

Для изучения колонизации растений штамм F2-2 был трансформирован плазмидой pMyCA_gfp, содержащей ген белка зелёной флуоресценции *gfp*, который даёт возможность колониям светиться в УФ-свете. Листья проростков горчицы были обработаны суспензией штамма F2-2. С использованием эпифлуоресцентной микроскопии продемонстрирована колонизация листьев и корней горчицы исследуемым штаммом (рис.).

Рис. Взаимодействие *R. qingshengii* F2-2 с проростками горчицы. Слева – колонизация корешков горчицы клетками бактерии; справа – защитный эффект штамма (колонизированное растение и проросток без колонизации)



Радиус зон угнетения роста микромицетов бактериями-антагонистами

Штаммы	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Gaeumannomyces graminis var tritici</i>
	Зона подавления роста, см		
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> BS1393	4,0	4,0	4,3
<i>Rhodococcus qingshengii</i> F2-2	1,5	0	1,0

Для изучения защитных свойств штамма F2-2 горчица была заражена фузариозом. Через 10 суток мы наблюдали активный рост горчицы, колонизированной исследуемым штаммом. У горчицы, не обработанной штаммом F2-2, наблюдали признаки заболевания: замедление роста и пожелтение листьев.

Таким образом, штамм-нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* F2-2 колонизирует листья и корни горчицы, содержит кластер генов биосинтеза феназинов, обладает антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов.

Литература

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Угледородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.
2. Puntus I.F., Borzova O.V., Funtikova T.V., Suzina N.E., Egozarian N.S., Polyvtseva V.N., Akhmetov L.I., Golovleva L.A., Solyanikova I.P., Shumkova E.S. Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation Journal of Soils and Sediments. 2019. V. 19. No 8. P. 3166–3177.
3. Суинова Т.В., Анохина Т.О., Сизова О.И., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кочетков В.В., Боронин А.М., Patil S.G., Chaudhari A.B. Штаммы PGPR *Pseudomonas*, перспективные для создания биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений. Биотехнология. 2017. Т. 33. № 2. С. 56–67.

Измерение эффективности терминаторов транскрипции в *Rhodococcus* с помощью флуоресцентных репортёров

Чуйко М.С., Шемякина А.О., Гречишников Е.Г., Лавров К.В., Яненко А.С.

Курчатовский геномный центр НИЦ «Курчатовский институт» (ГосНИИгенетика),
chuyko8642@gmail.com, lavrov.ko@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38376

Бактерии рода *Rhodococcus* являются перспективными биокатализаторами для применения в биоремедиации и органическом синтезе (см. ссылки 1–3 в [1]). Изучение свойств элементов для контроля экспрессии генов в *Rhodococcus*, таких как промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, важно для развития генетических технологий для этих бактерий. В настоящей работе впервые в *Rhodococcus* оценена эффективность терминации транскрипции, на примере двух фрагментов ДНК, терминатора транскрипции T0 из колифага λ [2], и фрагмента 3Н из *Rhodococcus rhodochrous* M8 (200 п.н.), расположенного после оперона генов нитрилгидратазы (номер AY654301.1 в NCBI GenBank).

Для оценки относительных уровней транскрипции использовались флуоресцентные репортёры turboGFP (модифицированный зелёный флуоресцентный белок из морского рачка *Pontellina plumate*, <https://evrogen.ru/products/fp/basic/turbo-colors/turbo-gfp>) и turboRFP (модифицированный красный флуоресцентный белок из морского анемона *Entacmaea quadricolor*, <https://evrogen.ru/products/fp/basic/turbo-colors/turbo-rfp>). С генами этих белков были сконструированы четыре кассеты вида «*cblA*-промотор-*gfp*»

фрагмент-*rfp*», где *cblA* – ген кобальт-зависимого транскрипционного регулятора, промотор – промотор генов нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8 [3], фрагмент – один из исследуемых фрагментов (Т0, 3Н в двух ориентациях, и контрольный фрагмент, не содержащий известных терминаторов транскрипции), *gfp* и *rfp* – гены, кодирующие turboGFP и turboRFP. Поскольку транскрипция в этих кассетах запускалась с одного промотора, расположенного перед *gfp*, экспрессия беспромоторного *rfp* (и, соответственно, красная флуоресценция клеток) могла возникать только в результате «протечки» транскрипции через исследуемый фрагмент. Поэтому, степень терминации транскрипции на испытуемом фрагменте оценивалась через соотношение красной и зелёной флуоресценций клеток родококков, содержащих указанные варианты кассеты (аналогичный метод в *E. coli* см. в [4]). Флуоресцентные светимости клеток, соответствующие turboGFP и turboRFP, измерялись при параметрах, специально отработанных для снижения взаимного влияния двух белков (turboGFP – возбуждение при 482 нм, испускание при 518 нм, turboRFP – возбуждение при 553 нм, испускание при 582 нм). Транскрипционный регулятор использовался для оценки терминации при разных активностях промотора нитрилингидратазы (активность различалась в 5 раз в присутствии и отсутствии кобальта, см. [5]).

Клетки *R. rhodochrous*, содержавшие плазмиды с указанными кассетами, выращивались в жидкой минимальной среде с глюкозой и мочевиной, в присутствии и в отсутствие кобальта, и их светимости измерялись в динамике. Для оценки степени терминации транскрипции использовались светимости, полученные на четвёртые сутки культивирования. С кобальтом, для контрольного фрагмента ДНК соотношение красный/зелёный оказалось около единицы. С фрагментом Т0, и с фрагментом 3Н в одной из ориентаций, это соотношение оказалось около 0,4 и 0,53, соответственно. Это указывало на сходные степени терминации, оцененные в 60% для Т0, и в 47% для 3Н. Фрагмент 3Н в противоположной ориентации давал соотношение ок. 0,95, то есть, практически не терминировал транскрипцию. Таким образом, исследованные фрагменты снижали экспрессию нижележащих генов примерно наполовину. Без кобальта, при светимостях, сниженных в 1,3–2,7 раз, степени терминации отличались от терминации при повышенной активности.

В исследовании [4], проведённом на *E. coli*, показано, что, под промотором средней силы (P_{bad}) эффективность большинства природных терминаторов транскрипции существенно превышает 50%, доходя до 90% и выше (в том числе и у использованного нами Т0). Возможно, оба использованных нами фрагмента являются слабыми терминаторами в *Rhodococcus*. С другой стороны, в нашей работе эффективность терминации (впервые) оценена в сочетании с сильным промотором. Можно предположить, что бóльшая сила промотора снижает эффективность терминации, хотя систематические данные об этом, насколько нам известно, отсутствуют.

Известно, что, в *E. coli*, для (фактор-независимой) терминации необходима как шпильчатая структура в транскрибируемой с данного фрагмента мРНК, так и U-богатый участок в мРНК после шпильки. Биоинформатический анализ последовательности Т0 и 3Н выявил в обоих предполагаемые шпильчатые структуры, но U-богатый участок был обнаружен только в Т0 (инструменты RNAstructure, <https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>, и Arnold, <http://rssf.i2bc.paris-saclay.fr/toolbox/arnold/>). Учитывая обнаруженные нами сходные эффективности терминации, можно предположить, что, помимо U-богатого участка, есть и другие факторы, обеспечивающие терминацию. На это указывает и однонаправленность эффекта терминации в 3Н, для которой биоинформатически не было выявлено никаких оснований.

Исследованные терминаторы транскрипции можно использовать в бактериях *Rhodococcus* для контролируемого снижения экспрессии генов, поставленных после таких терминаторов. Такой подход может быть востребован при конструировании продуцентов метаболитов и белков, и при разработке цельноклеточных биокатализаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075-15-2019-1659).

Литература

1. Grechishnikova E.G. et al. Rhodococcus: Sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform // Critical Reviews in Biotechnology. Taylor & Francis, 2022. P. 1–16.
2. Guevara G. Fernandez de Las Heras L, Perera J, Navarro Llorens JM. Functional differentiation of 3-ketosteroid Delta (1)-dehydrogenase isozymes in Rhodococcus ruber strain Chol-4 // Microb Cell Factories. 2017. Vol. 16, № 10.1186.

3. Shemyakina A.O. et al. A Set of Active Promoters with Different Activity Profiles for Superexpressing Rhodococcus Strain // ACS Synthetic Biology. ACS Publications, 2021. Vol. 10, № 3. P. 515–530.
4. Chen Y.-J. et al. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints // Nature methods. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 10, № 7. P. 659–664.
5. Lavrov K.V. et al. New cblA gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in Rhodococcus rhodochrous // Research in microbiology. Elsevier, 2018. Vol. 169, № 4–5. P. 227–236.

Светоиндуцируемые стрессовые белки HliA и HliB цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803

Шарапова Л.С., Юрина Н.П., Постникова Э.П.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, sharapova0902@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38377

Интенсивный солнечный свет вызывает повреждения фотосинтетического аппарата. Для защиты хлорофилл-белковых комплексов от светового стресса большое значение имеют светоиндуцируемые стрессовые белки, к которым относятся Hlips (high-light-inducible proteins) цианобактерий. Эти мембранные белки считаются предшественниками светособирающего комплекса высших растений и водорослей [1]. Hlips принимают участие в нефотохимическом тушении избыточно поглощённой световой энергии, сборке и репарации фотосистемы II, транспорте и связывании хлорофилла. Важная функция этих белков – связывание свободного хлорофилла и предотвращение образования активных форм кислорода [2]. В последнее время исследователи получили новые данные об особенностях Hlips [3], однако многое остаётся невыясненным. Ранее предполагали, что HliA и HliB образуют димеры и выполняют аналогичные функции. В недавних исследованиях [3] было установлено, что указанные белки не образуют димеров, а взаимодействуют с другими Hlips. Для выяснения структурных особенностей двух белков – HliA и HliB нами были использованы спектральные и биоинформатические методы. С помощью спектральных и биоинформатических методов нами было установлено, что HliA и HliB цианобактерии *Synechocystis* sp. не являются взаимозаменяемыми, так как имеют некоторые структурные, а, следовательно, и функциональные различия. Эти белки имеют небольшие размеры – 70 аминокислотных остатков. Выравнивание аминокислотных последовательностей HliA и HliB показало, что их идентичность составляет 87,14%. Оба белка содержат достаточно протяжённый трансмембранный участок – у HliA 23 аминокислотных остатка, у HliB – 24. Предсказанные модели HliA и HliB сходны (рис. 1 а, б).

С помощью сервера I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) на основании аминокислотной последовательности HliA и HliB были спрогнозированы структурные модели белков и функций, выпол-

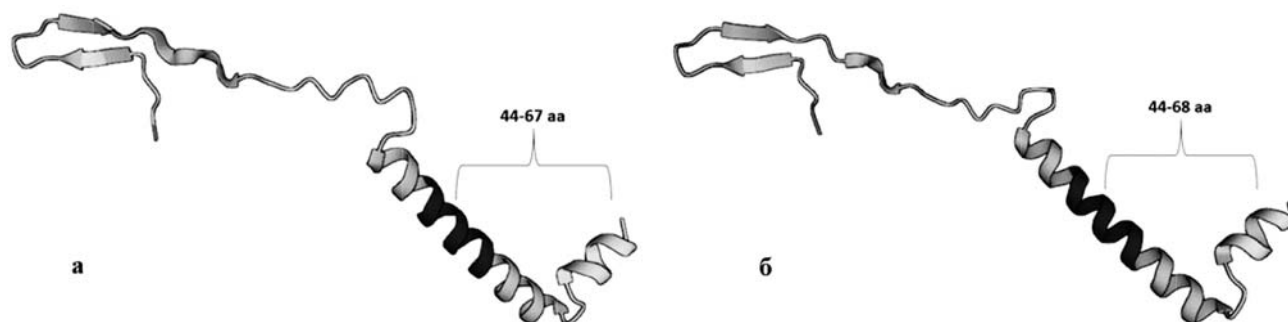


Рис. 1. Предсказанные модели, а – HliA, б – HliB. Фигурной скобкой показано положение и протяжённость трансмембранного участка (High light-inducible protein – *Synechocystis* sp. (strain PCC 6803 / Kazusa) | UniProtKB | UniProt, 29.09.22 г.)

няемых ими в клетке [4]. Оба белка были определены как мембранные и малорастворимые. В качестве наиболее вероятного лиганда для HliA и HliB был выбран хлорофилл а. Были выделены чистые рекомбинантные белки HliA и HliB. Для выделения и очистки HliA и HliB, на основе вектора pET-28a были сконструированы плазмиды, несущие синтетический ген белка (ЗАО Евrogen). Опыты велись последовательно, сначала с белком HliA, позже – с HliB. Рекомбинантный белок выделяли из клеток *E. coli* с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA смоле (Thermo-Fisher, США). При снятии очищенного белка с колонки буфером для элюции (15 мМ NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0,07 М KF, 0,015 М мочевины, 0,1 мМ PMSF, pH 4,5), HliB показал значительно большую гидрофобность по сравнению с HliA. Чтобы избежать образования белковых агрегатов, содержание мочевины в буфере для элюции было повышено до 8 М. Для выяснения структурных особенностей молекул белков HliA и HliB были измерены спектры флуоресценции. Она определяется флуоресценцией остатков триптофана (длина волны возбуждения 297 нм) и, в меньшей степени, остатков тирозина и фенилаланина (длина волны возбуждения 280 нм). В зависимости от их локализации в белковой глобуле и молекулярного окружения, спектр флуоресценции может иметь разную форму и положение максимума [5]. Спектры флуоресценции белков HliA и HliB проводили на спектрофлуорофотометре RF-5301 PC (Shimadzu, Япония) при 20 °С. Возбуждали при 295 нм (ширина полосы пропускания щели 2 нм) и регистрировали в диапазоне 300–700 нм (ширина полосы пропускания щели 5 нм) со скоростью 200 нм/мин. Данные, полученные при измерении флуоресценции белков, имели определённое сходство, однако значения максимумов не совпадали. Пик флуоресценции в диапазоне 610–700 нм для HliA наблюдается при 658 нм, для HliB – при 655 нм. Такие различия можно объяснить структурными особенностями HliA и HliB и аминокислотным составом белков. По-видимому, белки, несмотря на структурное сходство, не являются взаимозаменяемыми.

Литература

1. Staleva H., Komenda J., Shukla M.K., Šlouf V., Kana R., Polívka T., Sobotka R. Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins // *Nature Chem. Biol.* – 2015. – V. 11. – P. 287–292.
2. Komenda J., Sobotka R. Cyanobacterial high-light-inducible proteins – Protectors of chlorophyll–protein synthesis and assembly // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2016. – V. 1857. – P. 288–295.
3. Konert M.M., Wysocka A., Peter Koník P., Sobotka R. High-light-inducible proteins HliA and HliB: pigment binding and protein–protein interactions // *Photosynthesis Research.* – 2022. – V. 152. – P. 317–332.
4. Zheng W., Zhang C., Li Y., Pearce R., Bell E.W., Zhang Y. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations // *Cell Reports Methods.* – 2021. – V. 1. – I. 3.
5. Storm P., Hernandez-Prieto M.A., Eggink L.L., Hooper J.K., Funk C. The small CAB-like proteins of *Synechocystis* sp. PCC 6803 bind chlorophyll // *Photosynth Res.* – 2008. – V. 98. – P. 479–488.

Ферментный препарат на основе клеток *Nocardioides simplex* для получения ценных 1(2)-дегидрированных 3-кетостероидов

Яппаров Р.Р.¹, Фокина В.В.², Донова М.В.²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
hamache33345@gmail.com

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38378

1(2)-Дегидрирование является ключевой реакцией тонкого органического синтеза 1(2)-дегидростероидов, высоко востребованных в медицинской практике. В сравнении с насыщенными аналогами, 1(2)-дегидростероиды, как правило, вызывают меньше побочных эффектов при сохранении высокой терапевтической эффективности (Rohman and Dijkstra, 2019). В отличие от микробиологической транс-

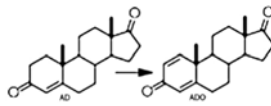
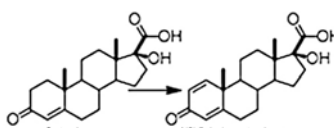
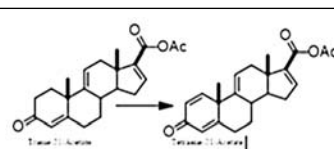
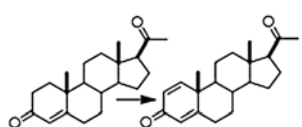
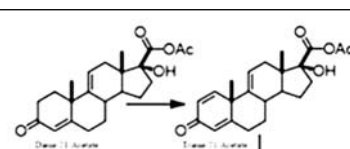
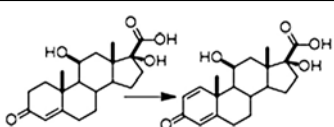
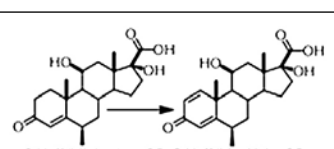
формации, применение ферментативных реакций обеспечивает высокую селективность продукции стероидных продуктов, что позволяет упростить процедуру их очистки (Tonin et al., 2020).

Штамм актинобактерий *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033D способен к эффективному 1(2)-дегидрированию 3-кетостероидов андростанового и прегнанового ряда. В его геноме выявлено пять генов, кодирующих 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы, предположительно, обладающие различной субстратной специфичностью (Shtratnikova et al., 2016). В присутствии индуктора – ацетата кортизона экспрессия одного из генов (*kstD2*) увеличивается более чем в 1200 раз (Shtratnikova et al., 2021). Известно, что в нативной клетке вероятным акцептором поступающих от 3-КСД окислительно-восстановительных эквивалентов является менахинон дыхательной цепи (Gale et al., 1962). Фермент также может использовать менадион в качестве искусственного акцептора электронов (Gale et al., 1962; Rohman and Dijkstra, 2019).

Целью данного исследования являлось создание на основе *N. simplex* комплексного ферментного препарата, эффективно осуществляющего 1(2)-дегидрирование различных 3-кето-стероидов.

Таблица 1

Эффективность полученного ферментного препарата при биоконверсии различных 3-кето-стероидных субстратов*

№	Субстрат	Схема реакции	Удельная активность ферментного препарата 3-КСД, нМ/мин·мг
1	Андростендион		5,82
2	Кортикостерон		4,81
3	Прегнагриен 21 ацетат		4,53
4	Прогестерон		2,65
5	Прегнадиен 21 ацетат		2,16
6	Гидрокортизон		1,53
7	6α-Метил-гидрокортизон		0,63

Выращивание культуры *N. simplex* проводили в ферментере (рабочий объем 8 л) аэробно (рО₂ 30%) при 30 °С на среде с глюкозой (15 г/л), дрожжевым экстрактом (20 г/л), КН₂РO₄ (4,4 г/л), Na₂НРO₄ (8,8 г/л), рН 6,9, которую засеивали 5% 24-ч инокулятом, выращенным на среде аналогичного состава. Индукцию 1(2)-дегидрогеназной активности осуществляли добавлением к растущей в ферментере 24-ч культуре 21-ацетата кортизона в виде спиртового раствора (конечные концентрации 0,2 и 0,6 г/л для 21-ацетата кортизона и этанола, соответственно). Выросшие индуцированные клетки собирали центрифугированием при 4000 об./мин 30 минут. Готовили суспензию клеток в буфере рН 6,9 и использовали для приготовления ферментного препарата или хранили при –18 °С в течение 6 месяцев до последующего использования. Суспензию клеток обрабатывали при интенсивном перемешивании ацетоном, отделяли центрифугированием, сушили, при растирании сухих клеток получали порошок ферментного препарата. Биоконверсию 3-кетостероидных субстратов проводили в среде с метилированным циклодекстрином и менадионом. Анализ продуктов биоконверсии проводили методом ТСХ в системе растворителей бензол : ацетон = 3:1, стероиды визуализировали в УФ-свете при 254 нм.

Оптимизировали следующие параметры: время и режим обработки клеток ацетоном, температуры, рН, концентрации биомассы и менадиона, концентрации субстрата и другие условия биоконверсии. Некоторые характеристики полученного препарата представлены в табл. 1.

Неоспоримыми преимуществами применения комплексного ферментного препарата по сравнению с нативными клетками *N. simplex* является отсутствие нежелательных реакций восстановления по 17β и 20β-позициям стероидной молекулы, а также деструкции стероидного ядра. Преимуществом препарата в сравнении с очищенными 3-КСД является простота, технологичность и дешевизна получения и расширение субстратного спектра.

Таким образом, получен ферментный препарат, обладающий 1(2)-дегидрогеназной активностью в отношении различных 3-кето-стероидов, найдены оптимальные условия его эффективного использования. Результаты имеют высокую практическую значимость для разработки новых технологий производства ценных 1-дегидростероидов.

Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-00024).

Литература

1. Rohman A., Dijkstra B.W. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2019, 191, 105366, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.015
2. Tonin F., Martì E, Arends I.W.C.E., and Hanefeld U. Catalysts 2020, 10(6), 677, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.3390/catal10060677
3. Shtratnikova V.Yu., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Bragin E.Y., Shutov A.A., Donova M.V. BMC Biotechnology 2021, 21, 7, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1186/s12896-021-00668-9.
4. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Pekov Yu.A., Ivashina T., Donova M.V. Curr. Genet. 2016, 62, 643–656, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1007/s00294-016-0568-4.
5. Gale P.H., Page A.C., Stoudt T.H., Folkers K. Biochemistry, 1962, 1(5), 788–792, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1021/bi00911a010

РЕСУРСНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Интегральная схема скрининга природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, перспективных для хересования виноматериалов

Авданина Д.А., Жгун А.А.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Москва,
d.avdanina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38379

Селекция штаммов дрожжей, перспективных для производства хересных вин, проводится с учётом региональной сырьевой базы – сортов винограда, географии, состава почв, климата. Наряду с этим классическим подходом современные методы сравнительной геномики позволяют понимать адаптационный механизм дрожжей *S. cerevisiae* и разрабатывать удобные маркеры для определения стратегий направленного отбора штаммов.

Херес или Шэрри – это особая группа креплёных вин с уникальными органолептическими свойствами. Вина получают под пленкой специфических хересных дрожжей *S. cerevisiae* в дубовых бочках. Традиционно торговая марка вина «Jerez-Xérès-Sherry» и «Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda» является контролируемой по происхождению регионом Andalusia в Испании [1, 2]. Созревание хересных вин, до недавнего времени было ограничено так называемым «хересным треугольником», то есть тремя городами Jerez de la Frontera, Sanlúcar de Barrameda и El Puerto de Santa María. Довольно длительное время шла конфронтация между основными производителями хереса в основном касающиеся тонкостей технологического производства. Это вылилось во внесение поправок и допущений Хересным Комитетом в Испании в 2021 г. [3]. В настоящее время производственная зона расширена и занимает площадь около 7000 га – это все белые земли Albariza. Важным допущением в правилах является тот факт, что в случае достижения виноматериалом крепости в процессе ферментации в 15% (по этанолу), его не следует подвергать креплению. Также в поправки входит включение аборигенных испанских шести сортов винограда, ранее не использовавшихся [4]. Кроме Испании хересные вина, имеющие сертификат подлинности происхождения Denominación de Origen, изготавливаются в Италии (Сардиния), Франции (Юра), Венгрии (Токай-Хегайя). Хересоподобные вина производятся в США, Австралии, Южной Африке, на Кипре – благодатных краях с климатом, способствующим росту и созреванию виноградной лозы. В Британии из импортированного виноградного суслу производят популярные Шэрри. С начала XX в. вина такого типа производятся и в России. В настоящее время известны хересные вина, производимые на Таманском полуострове, в Ростовской области, в Республике Дагестан. В Республике Крым в НПО «Магарач» [5] и на производственно-аграрном объединении «Массандра» (г. Ялта) ведутся многочисленные научные работы, направленные на изготовление и улучшение качеств креплёных вин. Хересный сорт белого вина производится и в Украине на заводе Shabo в Одессе. Также своими хересными

винами Ialoveni известна Молдова, работа по созданию которых начиналась в тесном сотрудничестве с основателями этого производства из СССР [6,7].

Основными типами классических сухих хересных вин в Испании являются – Fino, Oloroso, Amontillado, а также Manzanilla и Palo Cortado которые получают из одного и того же базового вина, но подвергаются разным процедурам старения [8]. Также существуют купажированные ликерные вина – Dry, Pale Cream, Medium и Cream и натуральные сладкие хересы из вяленого винограда – Pedro Ximénez, Moscatel и Dulce. Но в технологическом плане интерес представляют вина типа Fino и Oloroso, первое из которых изготавливается из винограда первого отжима, имеет крепость 15–15,5% и подвергается биологическому старению под плёнкой хересных дрожжей, а для второго используется второй отжим суслу, крепится вино до 17–22%, в результате чего хересные дрожжи, как и другая посторонняя микрофлора погибают и вино проходит окислительное старение без флора (без дрожжевой плёнки). Вина созревают в ярусной системе бочек «солера-криадера» как минимум 5 лет.

В настоящее время появляется всё больше виноделов, внедряющих достижения современной науки в технологию производства вин, в том числе и хереса. Для виноделов является актуальной задачей оказывается поиск новых штаммов дрожжей среди природного многообразия, способных к хересованию виноматериала. Методы молекулярной биологии и генетической инженерии позволяют контролировать изменения в экспрессии многочисленных генов у *S. cerevisiae*, вовлечённых в клеточную адгезию, стрессоустойчивость, поглощение железа, в метаболизме азота, углерода и жиров, и т.д., определяющие специфику функционирования хересных дрожжей. Такой современный подход к пониманию адаптационного механизма дрожжей *S. cerevisiae* позволяет разработать удобные генетические маркеры для определения стратегий направленного отбора новых природных штаммов, пригодных для хересования.

На основании ряда работ [9–12] предлагается интегральная схема (рис. 1) селекции хересных штаммов, включающая скрининг по классическим молекулярно-генетическим маркерам (ITS, полиморфизм гена адгезина FLO11, полиморфизм гена YDR379C-A, кодирующего SDH6-субъединицу митохондриальной сукцинатдегидрогеназы). Ещё одним интересным генетическим маркером, который может служить критерием отбора хересных штаммов *S. cerevisiae*, является полиморфизм локусов AFT1 и FRE-FIT, позволяющий селектировать дрожжевые изоляты по «железочувствительности», поскольку хересные дрожжи исторически селективировались на виноматериале с белых меловых почв, обеднённых железом. Живые организмы приспособились к регуляции динамики концентрации железа в среде. Как избыток, так и недостаток железа в среде оказывается негативным для формирования дрожжевой плёнки, снижает концентрацию ароматобразующих альдегидов и ведёт к помутнению готового продукта. Ранее было показано [11], что хересные штаммы дрожжей более чувствительны к повышенной концентрации железа в среде по сравнению с винными штаммами, но лучше аккумулируют железо при росте на железodefицитных

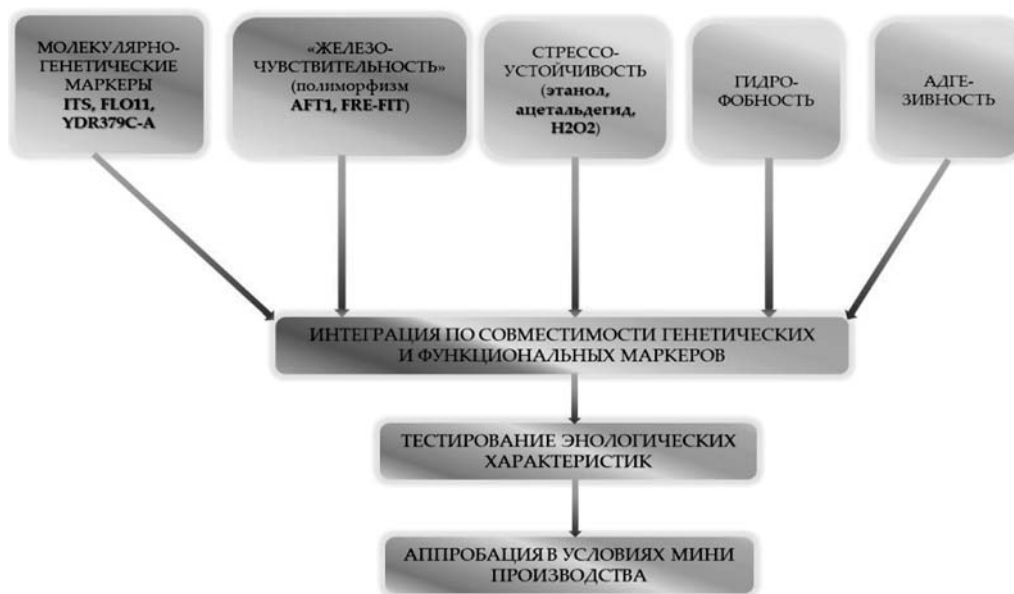


Рис. 1. Интегральная схема скрининга «хересных» штаммов дрожжей *S. cerevisiae*

средах. Эти признаки коррелируют с наличием мутации Q648X в транскрипционном факторе Aft1p, приводящей к образованию усечённой формы этого белка, с хромосомной перестройкой, приводящей к делеции FRE-FIT кластера, содержащего гены железоредуктаз Fre3p и Fre5p, и GPI-заякоренных мембранных белков Fit2p и Fit3p, отвечающих за удержание в клеточной стенке железа, связанного с сидерофорами.

По результатам проведённых нами исследований [9–11] показано, что классические генетические маркеры и маркеры «железочувствительности» при их комбинированном использовании показывают высокую вероятность отбора «хересных» штаммов, поскольку в индивидуальном применении каждый из них имеет определённый процент ошибки

Следующим этапом отбора является тестирование штаммов по энологическим характеристикам, адаптация наилучших штаммов к повышенной концентрации спирта и последующая апробация в условиях минипроизводства [9].

Литература

1. Sanchez C. The Big Book of Sherry Wines. The Region / ed. Sanchez C.S. Regional Ministry of Agriculture and Fisheries, 2006. 323 p.
2. Ruiz-Muñoz M. et al. Improving an Industrial Sherry Base Wine by Yeast Enhancement Strategies // Foods 2022, Vol. 11, Page 1104. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 11, № 8. P. 1104.
3. sherry.wine. [Electronic resource]. 2022. URL: <https://www.sherry.wine/> (accessed on 30.05.2022).
4. Cruess W.V. Investigation of the Flor Sherry Process // California Agricultural Experimental Station. 1948. Vol. 710.
5. Kishkovskaia S.A. et al. Flor Yeast Strains from Culture Collection: Genetic Diversity and Physiological and Biochemical Properties // Appl. Biochem. Microbiol. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, 2017. Vol. 53, № 3. P. 359–367.
6. Saenko N.F., Kozub G.I., Averbukh B.Y., Shur I.M., Kozub G.I. Kartya Mol. Chisinau, 1975. 160 p.
7. Kozub G.I. Fine and sparkling wines of Moldova. Kartya Mol. Chisinau, 1983. 275 p.
8. Pozo-Bayón M.A., Moreno-Arribas M.V. Sherry Wines: Manufacture, Composition and Analysis // Encycl. Food Heal. Elsevier Inc., 2016. P. 779–784.
9. Kishkovskaia S.A. et al. Screening for Promising Yeast Strains for Sherry Wine Production Using Genetic and Enological Markers // Sel'skokhozyaistvennaya Biol. Russian Academy of Agricultural Sciences, 2021. Vol. 56, № 3. P. 537–548.
10. Eldarov M.A. et al. Stress Resistance and Adhesive Properties of Commercial Flor and Wine Strains, and Environmental Isolates of *Saccharomyces cerevisiae* // Fermentation. MDPI, 2021. Vol. 7, № 3.
11. El'darov M.A. et al. Polymorphism of the Iron Homeostasis Genes and Iron Sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* Flor and Wine Strains // Microbiol. (Russian Fed. Pleiades Publishing, 2019. Vol. 88, № 2. P. 200–205.
12. Avdanina D. A., Zghun A.A. Sherry Wines: Worldwide Production, Chemical Composition and Screening Conception for Flor Yeasts // Fermentation. 2022. Vol. 8. P. 381.

Цитотоксический эффект низкомолекулярного пептида из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D на бактерии рода *Listeria*

Аринбасарова А.Ю.¹, Борзенков В.Н.², Меденцев А.Г.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
aarin@rambler.ru

² Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, г. Оболensk

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38380

Бактерии рода *Listeria* широко распространены в природе и часто загрязняют пищевые продукты животного и растительного происхождения. Известно 2 патогенных вида (*L. ivanovii* и *L. Monocytogenes*), попадание которых в организм с пищей, представляет высокий риск развития опасных инфекционных заболеваний. У прочих видов листерий не выявлен фактор патогенности, и они могут использоваться как модельные системы для изучения противомикробных соединений [1].

Антимикробные пептиды являются важнейшими компонентами антибактериальной защиты организмов практически всех уровней жизни – бактерий, грибов, растений, амфибий, насекомых, птиц и млекопитающих [1–4].

Ранее был получен антимикробный низкомолекулярный пептид, продуцируемый грибом *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D. Его антимикробная активность была показана на грамположительных бактериях *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus subtilis*. Установлено, что механизм его антимикробного действия обусловлен деэнергизацией цитоплазматической мембраны бактерий или внутренней мембраны митохондрий [5].

В настоящей работе исследовано антимикробное действие низкомолекулярного пептида из *Trichoderma* против бактерий рода *Listeria*.

В работе тестировали бактерии *Listeria grayi* МКМ-1 (мясо-костная мука, 2010 г.), *L. innocua* М-4 (мышь, 2010), *L. seeligeri* ATCC 35967 (почва, 2001 г.) и *L. welshimeri* Bel-19 (мясные полуфабрикаты, 2020 г.), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (номера доступа соответственно В-7384, В-6643, В-7767 и В-4799).

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом с использованием питательного агара Muller Hinton (МН) (HiMedia, Индия) и стандартных бумажных дисков (НИЦФ, Россия).

Механизм антибактериального действия пептида исследовали по его влиянию на мембранный потенциал целых клеток бактерий. Трансмембранный потенциал измеряли на 2-лучевом флуоресцентном спектрофотометре Hitachi 850 (Япония) с помощью потенциал-зависимого флуоресцентного красителя 3,3'-дипропилтиодикарбонил-цианид иодида (ДПЦИ), регистрируя его энергозависимый транспорт [5].

В таблице представлены данные изучения антимикробного действия пептида на рост грамположительных бактерий рода *Listeria*. Из таблицы следует, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) пептида, определенная методом диффузии в агар, для всех штаммов составляла 6 мкг в лунке. По предварительным данным хлорамфеникол оказывал менее токсичное действие на тестируемые бактерии, по сравнению с пептидом.

Характер антимикробного действия пептидов различен – одни пептиды (бактенецины, аципенсины) инактивируют бактерии без существенного повреждения их мембран. Другие, например, протегрин, напротив, вызывает быстрое нарушение структурной целостности бактериальных мембран.

Таблица

Антимикробная активность пептида

Доза пептида, мкг в лунке		100	50	25	12.5	6	3
Зона ингибирования, мм	<i>L. grayi</i> МКМ-1	21	20	15	8	4	0
	<i>L. innocua</i> М-2	22	20	18	7	4	0
	<i>L. seeligeri</i> ATCC 35967	25	22	19	17	6	0
	<i>L. welshimeri</i> Bel-19	27	25	20	12	7	0

Добавление клеток к среде, содержащей потенциал-зависимую флуоресцентную краску ДПЦИ, приводило к уменьшению флуоресценции, обусловленному энергозависимым транспортом ДПЦИ в клетки (кривые 1). Последующее добавление пептида приводило к восстановлению флуоресценции до первоначального уровня (за счет выхода ДПЦИ из клеток). Аналогичное действие оказывал трифторкарбонилцианид-фенилгидразон (ТФКФ), классический разобщитель окислительного фосфорилирования (кривая 2).

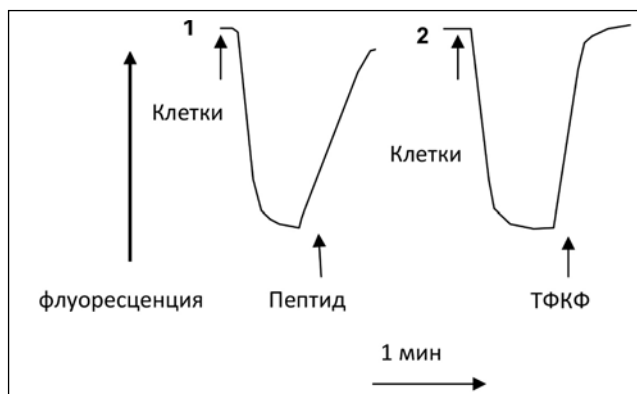


Рис. 1. Влияние пептида на мембранный потенциал бактерий *L. grayi* МКМ-1. Пептид – 10 мкг, ТХКФ – 5 мкМ, клетки бактерий 1.2 мг/мл

Пептид также увеличивал скорость потребления кислорода интактными клетками, что объясняется разобщающим действием на окислительное фосфорилирование.

Следовательно, антибактериальный механизм действия пептида, выделенного ранее из гриба *Trichoderma* [5], обусловлен нарушением проницаемости мембраны бактерий и снижением мембранного потенциала клеток.

Литература

1. Mohan V., Wibisono R., de Hoop L., Summers G., Fletcher G.C. Identifying Suitable *Listeria innocua* Strains as Surrogates for *Listeria monocytogenes* for Horticultural Products // *Front Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2281.
2. Zhang L.J., Gallo R.L. Antimicrobial peptides // *Curr. Biol.* 2016. V. 26(1), P. 14–9.
3. Lee J., Lee D.G. Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis. *J Microbiol Biotechnol.* 2015. V. 25(6). P. 759–64.
4. Yasir M., Willcox M.D.P., and Dutta D. (2018). Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Materials* 11:E2468.
5. Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г. Низкомолекулярный антимикробный пептид *Trichoderma cf. Aureoviride* Rifai VKMF-4268D // *Микробиология.* 2017. Т. 86, №2, 9–12.

Получение пигмента из биомассы микроводорослей

Баранова С.В.

Российский биотехнологический университет (бывш. МГУПП), Москва,
baranova.sph@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38381

Стремительное развитие пищевой промышленности обеспечивает постоянное внедрение инноваций в направление получения пигментов из растительного сырья. Сдерживающим же фактором является низкое содержание физиологически активных пигментов из-за неэффективного выделения, а также их неустойчивость к изменяющимся условиям окружающей среды.

В последние десятилетия в качестве сырьевой базы для получения каротиноидов рассматривают *Dunaliella salina* – вид одноклеточных зеленых микроводорослей, обитающих в основном в соленых морях. Одним из главных преимуществ водорослей является их высокая антиоксидантная активность, которая достигается за счет изомеров каротиноидов в химическом составе.

Целью исследования для данного литературного обзора (тезисов) была разработка технологии выделения β -каротина из нетрадиционного сырья – биомассы микроводорослей с помощью безопасных пищевых растворителей, растительных масел.

Процесс выделения пигмента можно разделить на 2 этапа: I этап: выращивание микроводорослей в стеклянных фитобиореакторах с модифицированной питательной средой Тренкеншу до стационарной фазы и исчерпания запаса минеральных веществ. II этап: происходит увеличение показателей интенсивности освещения и солености среды, после чего отсепарированная и уже высушенная при температуре 40 °С биомасса микроводорослей становится сырьем для дальнейшей экстракции и получения β -каротина. Сама экстракция происходила путем трехкратного настаивания с последующей сменой экстрагента и гомогенизацией смеси. Также учитывалась необходимость избегать изменения каротиноидов при воздействии высоких температур и света.

В качестве экстракции был выбран статический периодический метод, а в качестве экстрагента подсолнечное, кукурузное и соевое масла. По окончании исследования было установлено, что наибольшая экстракция протекает в кукурузном и подсолнечном маслах, что подкрепляется данными содержания β -каротина на 100 г экстракта. Также было доказано, что для максимального экстрагирования пигмен-

та необходимо соблюдать температурный режим порядка 30 °С, соотношение биомассы микроводорослей к маслу 1:20, и оптимальную продолжительность процесса экстракции в 4 дня.

Полученный экстракт обладает жидкой консистенцией, темно-красным оттенком и нейтральным запахом. Все эти органолептические показатели способствуют широкому применению в различных отраслях пищевой промышленности, а также в качестве отдельной пищевой добавки.

Таким образом, тезисы исследования показывают возможность применения данной методики в получении пигмента для нужд пищевой, косметической или фармацевтической промышленности, что значительно снизит закупки каротиноидов из-за рубежа и позволит наладить отечественное производство.

Литература

1. Чернова Л.А., Горбань В.Г., Антоненко С.П., Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Получение масляного экстракта каротиноидов из микроводоросли *dunaliella salina* Teod // Бюллетень ГНБС. 2013. № 108. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-maslyanogo-ekstrakta-karotinoidov-iz-mikrovodorosli-dunaliella-salina-teod> (дата обращения: 31.10.2022).

Физиологические особенности и метаболический потенциал галотолерантной бактерии *Pseudomonas xanthomarina* штамм NP2(1570), выделенной из сверхглубоких высокоминерализованных подземных вод

Барина А.В.¹, Попова Н.М.¹, Бабич Т.Л.², Сафонов А.В.¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

²Институт микробиологии им.С.Н.Виноградского РАН, Москва,
barinovaalisa2@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38382

Загрязнение окружающей среды высокотоксичными поллютантами является серьезной проблемой при интенсивном развитии разных отраслей промышленности. Особые проблемы создают нефтедобывающая и нефтеперерабатывающие промышленности, предприятия рудодобычи и рудопереработки, а также радиохимическая промышленность. Наиболее остро стоит проблема комплексного загрязнения окружающей среды, например сырая нефть может содержать значительное количество тяжелых металлов и радионуклиды. Различные отработанные масла атомной промышленности часто имеют достаточно серьезный уровень радиоактивного загрязнения. Если для очистки почв и открытых водоемов существует ряд эффективных способов очистки, включающие биоремедиацию, то при загрязнении подземных вод единого высокоэффективного подхода к очистке на сегодняшний день не существует.

Одним из перспективных современных методов для очистки поверхностных и подземных вод является *in situ* биоремедиация, с использованием метаболического потенциала аборигенной или интродуцированной микробиоты, способной обеспечить удаление комплексного загрязнения (нефтепродукты, восстановленные и окисленные формы азота, тяжелые металлы, радионуклиды). В случае длительного загрязнения часто физиологический потенциал аборигенной микробиоты снижен и требуется использование интродуцированных устойчивых в широком диапазоне кислотности и концентраций солей природных непатогенных штаммов.

В данной работе изучен метаболический потенциал и физико-химические параметры роста штамма галотолерантной бактерии *Pseudomonas xanthomarina* штамм NP2(1570), выделенной из сверхглубоких высокоминерализованных подземных вод (глубина 1570 м) хранилища жидких радиоактивных отходов НИИАР (Димитровград). Данный водоносный горизонт имеет естественное солесодержание около 120 г/л, в горизонте наблюдается наличие естественных углеводов и техногенных нитрат-

ионов, тяжелых металлов и радионуклидов. Таким образом, данный штамм может быть перспективен для удаления комплексных загрязнений, включая нефтепродукты, тяжелые металлы, радионуклиды.

При анализе полного генома штамма были обнаружены гены деградации ксенобиотиков: бензоатов и галогензамещенных производных, ксилола (*benA-xylX*, *catA* и др.), хлоралканов и хлоралкенов (*frmA* и др.), нафталина и других химических соединений, гены устойчивости к тяжелым металлам (цинк, хром (*chrA*), кадмий (*czcA*)). Кроме того, штамм обладает генами, участвующими в иммобилизации урана (*ppk*, *rhoB*, *rhoU*, *cytochrome c*, *mtrC* и др.), что делает его перспективным для использования в биоремедиации.

Pseudomonas xanthomarina штамм NP2(1570) использует большой спектр субстратов. Наиболее активный рост наблюдался на: лактате, пирувате, глюконате, D-маннитоле, глицероле, ацетате, мальтозе, этаноле, D-глюкозе, D-манносе, фруктозе, D-рибозе, D-галактозе, крахмале, желатине, D-мелибиозе, L-аргинине, L-лизине, L-орнитине.

Установлено, что *Pseudomonas xanthomarina* NP2(1570) курсив является эврибионтой культурой, имеющей широкую экологическую пластичность (диапазон температур от 5 °C до 40 °C, диапазоне солености до 75 г/л). Культура может расти в средах со значениями pH от 6 до 10 в диапазоне экологической валентности от 6 моль/л до 10 моль/л. Было установлено, что штамм *Pseudomonas xanthomarina* NP2(1570) способен использовать легкие фракции нефти даже при отсутствии биосурфактантов, что делает его перспективным для использования в биоремедиации нефтяных загрязнений в том числе условиях с высоким солесодержанием.

Культура способна образовывать восстанавливать нитрат-ионы до конечного продукта молекулярного азота, а также образовывать биопленки, что делает ее перспективной для биоремедиации тяжелых металлов и радионуклидов в составе радиоактивных отходов.

Физиолого-биохимические и генетические особенности полиэкстремофилии уникальных багрянковых микроводорослей *Galdieria* и их биотехнологический потенциал

Большевцева Ю.В.¹, Стадничук И.Н.²

¹ ФИЦ Биотехнологии, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва,
stadnichuk@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38383

Красные микроводоросли *Galdieria* в составе таксона Cyanidiales являются полиэкстремофилами, обитающими в горячих серных источниках в присутствии ионов тяжелых металлов при pH 1-3 и температуре, достигающей 56 °C. Эти уникальные по своим свойствам фотосинтетики в ходе эволюции очень рано отделились от других красных водорослей и благодаря параллельному переносу генов от ацидотермофильных архей и бактерий заселили геотермальные вулканические зоны, где невозможно существование никаких иных эукариотных микроорганизмов. Вследствие уникальности свойств и возможности секвенирования генома виды-представители рода *Galdieria* служат перспективным биотехнологическим ресурсом, так как условия роста в естественных условиях и лабораторного и промышленного культивирования избавляют их от конкуренции со стороны других групп микроводорослей, воздействия патогенов и поедания консументами. Способность к хемо- и фотогетеротрофии увеличивает биопродуктивность этих водорослей до сравнимой с продуктивностью одноклеточных грибов. Направлениями использования *Galdieria* являются расширение процесса производства биодизельного топлива, биоремедиация агрессивных химических стоков, извлечение ценных металлов из токсичных отходов производства, наработка термостойких ферментов и новых лекарственных препаратов, осуществление возможности переноса генетического материала между представителями различных таксонов водорослей

и использование в генетических модификациях цветковых растений. Эти направления исследований стремительно развиваются в самые последние годы и подробно изложены (см. обзоры Стадничук, Тропин, 2022; Saura et al., 2022; Yamashita et al., 2022).

Изучение биохимических особенностей *Galdieria* обогащает наши представления о возможных экологических границах обитания эукариот и изменениях клеточного метаболизма, позволяющих выживать в условиях, являющихся губительными для подавляющего числа иных организмов. Наши кариологические исследования позволили установить, что клетки *Galdieria* содержат минимальное для эукариот число хромосом, равное двум; был также выявлен особый механизм ингибирования биосинтеза хлорофилла и фикобилинов, связанный с жизнью этих микроводорослей в кислой среде и обнаружен особый тип высоковетвленного крахмала, запасаемого клетками при переходе от фотосинтеза к гетеротрофному типу питания (Stadnichuk et al., 1998). В настоящее время для выявления внутриклеточных регуляторных связей *Galdieria* нами осуществляется поиск фитогормонов, аналогичных гормонам высших растений (сведения о гормональном статусе этих микроводорослей на сегодня отсутствуют).

Регуляторами и сенсорами биохимических и физиологических процессов у растений служат фоторецепторные белки, глюкозо-гексокиназная система, активные формы кислорода, ионы Ca^{2+} , различные липиды и жирные кислоты, сахароза, мелатонин, метилглиоксаль, олигопептиды и другие соединения. Например, трипептид глутатион, как показано для багрянок, является сенсором изменений редокс-состояния клеток. Глюкоза, оставаясь основой энергетического обмена, выполняет у *Galdieria* регуляторные функции, связанные с координацией фотосинтеза и дыхательных процессов. В частности, глюкоза ингибирует биосинтез фотосинтетических пигментов. Однако важнейшими в микромире являются механизмы световой и гормональной регуляции клеток. У растений в целом известно четырнадцать фоторецепторов: пять фитохромов, три криптохрома, два фототропина, три белка «Zeitlupe» и один УФ-В рецептор UVR8. Установлено шесть основных групп фитогормонов: абсцизовая кислота, ауксины, брассиностероиды, гиббереллины, цитокинины и этилен. Список может быть расширен за счет соединений, проявляющих сходную с гормонами активность, таких как жасмоновая и салициловая кислоты, олигопептиды глутатион и мелатонин и др. (Войцеховская, 2019). Многообразная система гормонов, как и обилие фоторецепторов, по-видимому, не являются необходимыми для микроводорослей как одноклеточных организмов, но такие гормоны как абсцизовая кислота являются универсальными, появляясь в ходе эволюции уже у цианобактерий. Нам не удалось выявить у *Galdieria* активность абсцизовой кислоты, которая должна проявляться в ответ на солевой стресс в виде замедления репликации ДНК и увеличения времени клеточного цикла. Наоборот, удалось обнаружить активность, присущую наличию цитокинина, который также является широко распространенным гормоном в растительном царстве. Установленное наличие фитогормонов повышает биотехнологический потенциал *Galdieria* с используемыми возможностями применения.

Литература

1. Войцеховская О.В. (2019) Фитохромы и другие (фото) рецепторы информации у растений. Физиол. Раст., 66, 163–177.
2. Стадничук И.Н., Тропин И.В. Полиэкстремофильные эукариоты Cyanidiales (2022) Биохимия, 87, 642–659.
3. Saura P.P., Chabr M., Corato A., Cardol P., Remacle C. (2022) Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources. Front. Plant Sci., <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.3389/fpls.2022.978246>
4. Stadnichuk I.N., Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Yu.V., Yurina N.P., Karapetyan N.V. (1998) Inhibition by glucose of chlorophyll *a* and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation., Plant Sci., 136, 11–23.
5. Yamashita S., Jong L.W., Tomita R., Iwane A.H., Miyagishima S.-Y. (2022) Life cycle and functional genomics of the unicellular red alga *Galdieria* for elucidating algal and plant evolution and industrial use. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 119, <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1073/pnas.2210665119>

Влияние перфорирования клеточных мембран на дыхательную активность бактерий

Быков А.Г.¹, Барсук Д.А.², Решетилов А.Н.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
e-mail: agbykov@rambler.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Пушкинский государственный естественно-научный институт»

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38384

В качестве биорецептора могут использоваться различные биологические материалы, например, клетки, отдельные ферменты. Альтернативой отдельным ферментам и целым клеткам могут служить мембранные фракции (МФ) микроорганизмов, представляющие собой ферменты клеточных мембран, локализованные в липидном окружении и находящиеся в более защищенном состоянии по сравнению со свободными ферментами. Сходный с МФ биоматериал можно получить перфорированием (пермеабиллизацией) клеточных мембран микроорганизмов с помощью химических или физических воздействий.

Обычно используются два основных типа реагентов: органические растворители (метанол и ацетон) и детергенты (сапонин, растительный гликозид, Triton X-100 и Tween 20). Метанол и ацетон растворяют липиды клеточных мембран [1]. Неионогенные детергенты, такие как Triton X-100 и Tween 20, содержат незаряженные гидрофильные головные группы, состоящие из фрагментов полиоксиэтилена [2]. Перфорирование клеток с использованием Triton X-100 обусловлено его способностью воздействовать на фосфолипиды внутренней мембраны, таким образом растворяя мембрану. Холат и додецилсульфат натрия действуют на цитоплазматическую и наружную клеточные мембраны. Химические вещества, такие как кислоты и щелочи, не являются селективными и обладают способностью повреждать ферменты и метаболиты вместе с клеточной стенкой [3].

Целью работы являлось изучение влияния перфорирования клеточных мембран детергентом Triton X-100 на дыхательную активность бактерий. В качестве рецепторного элемента использовали штамм *Gluconobacter oxydans sbsp. industrius* ВКМ В-1280.

Усвоение субстратов оценивали по дыхательной активности микроорганизмов с помощью полярографического метода. Регистрируемым параметром при введении субстрата являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода. Бактерии (1 мг сырой биомассы) иммобилизовали

Таблица

**Аналитические параметры биосенсоров
в зависимости от концентрации детергента (Triton X-100)**

Модификация рецептора детергентом Triton X-100	V_{max} , нА/с	K_M , мМ	Диапазон детекции, мМ	Линейный диапазон, мМ
Контроль	5.56±0.35	2.87±0.33	0.025–5.0	0.29–1.75
0.1% – 10 мин	2.89±0.12	1.01±0.09	0.025–5.0	0.25–1.26
0.2% – 10 мин	2.09±0.13	1.04±0.13	0.025–5.0	0.23–1.50
0.3% – 10 мин	2.58±0.11	1.18±0.10	0.025–5.0	0.39–2.09
0.5% – 10 мин	2.21±0.18	1.44±0.18	0.025–5.0	0.34–1.89
1.0% – 10 мин	2.29±0.18	1.42±0.24	0.025–5.0	0.45–2.51

на нейтральном носителе (хроматографическая стеклобумага GF/A) методом физической адсорбции. Измерение проводили в 25 мМ фосфатном буферном растворе (рН 6.5). Перфорирование иммобилизованных на нейтральном носителе бактерий штамма *Gluconobacter oxydans sbsp. industrius* ВКМ В-1280 осуществляли в растворе Triton X-100 в течение 10 минут. В качестве контроля использовали целые (не обработанные в растворе детергента) клетки бактерий. Важно было оценить негативные эффекты, оказываемые применённым методом на дыхательную активность бактериальных клеток. Данные калибровочных зависимостей аппроксимировали трехпараметрическим уравнением Хилла. Полученные результаты представлены в таблице.

Вне зависимости от использованной концентрации детергента кинетические константы уменьшились, в среднем, в 2 раза. V_{\max} снизилось в сравнении с контролем составляющим 5.56 нА до 2–2.8 нА. K_M снизилась с 2.87 мМ до 1.0–1.4 мМ (от 2.8 до 2 раз в зависимости от концентрации детергента). Исследованием показано, что введение детергента Triton X-100 приводит к незначительному увеличению дыхательной активности биоматериала. Полученные данные могут быть использованы при создании амперометрических микробных биосенсоров или микробных топливных элементов.

Литература

1. *Jamur M.C., Oliver C.* Permeabilization of Cell Membranes. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. 2010. V. 588. pp. 63–66. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1007/978-1-59745-324-0_9.
2. *Bhairi S.M.* Detergents. *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems*. (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA). 1997. 43 p.
3. *Prapulla S.G., Karanth N.G.* Fermentation (Industrial). Recovery of Metabolites. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014. V. 1. pp. 822–833. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1016/B978-0-12-384730-0.00109-9

Разработка технологии получения протеолитических ферментных препаратов на основе микромицетов

Голомидова В.И., Устюжанинова Л.В.

Вятский государственный университет, г. Киров,
golomidovavi@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38385

Протеолитические ферменты представляют интерес для биотехнологии как экономически привлекательные биомолекулы. В настоящее время одно из актуальных направлений современной биотехнологии связано с производством микробных ферментов, в том числе ферментов, продуцируемых микромицетами. Ряд основательных преимуществ микромицетов, таких как способность секретировать большое количество внеклеточных ферментов в среду, возможность культивирования их на простых средах, высокая скорость роста, стабильность получаемых ферментных препаратов, позволяет использовать их в качестве продуцентов протеаз. Протеазы могут использоваться во многих сферах промышленности, в том числе в пищевой промышленности для изготовления сыра и молочкосодержащих продуктов. В современном мире спрос на использование протеолитических ферментов в пищевой промышленности растёт вместе с объёмами потребления подобной продукции. В классической схеме производства используются в первую очередь ферменты животного происхождения. Однако при таком плане получения сыра и молочкосодержащей продукции появляются экономическая и этическая проблемы. Внедрение альтернативных путей получения протеолитических ферментов решают отражённую выше проблематику [1].

Одна из основных задач данного исследования – получение активного продуцента протеаз. В отборе участвовали штаммы микромицетов, ранее выделенные на кафедре с куска мяса с признаками плесне-

вения. Качественное определение протеолитической активности проводилось в ходе культивирования исследуемых штаммов микромицетов на молочном агаре с 10% содержанием обезжиренного молока в термостате при температуре 25 °С в течение 7 суток. После культивирования определяли зоны просветления вокруг колоний. Осмотр проводился на 5 и 7 сутки [2]. Результаты по тесту на протеолитическую активность представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Определение протеолитической активности
на молочном агаре**

Название штамма	Зона просветления агара на 5 сутки, мм	Зона просветления агара на 7 сутки, мм
M1	22,5	35,0
M2	10,2	22,0
M3	0,0	0,0
M4	21,0	33,0
M5	24,0	35,0
M6	23,5	35,0
M7	Учет невозможен	Учет невозможен

Далее провели тест на желатиназу. Качественное определение наличия желатиназы у исследуемых штаммов проверяли в ходе культивирования выделенных микромицетов на среде МПБ с добавлением 10% желатины. Пробирки культивировали в термостате при температуре 25 °С в течение 7 суток. Наличие желатиназной активности показывает «текучесть» желатина [2]. Результаты теста на желатиназу представлены в табл. 2.

Таблица 2

Качественное определение наличия желатиназы

Название штамма	Наличие роста	Характер роста	Изменение в текучесть желатина
<i>7 суток</i>			
M1	+	Поверхностный	Нет изменений
M2	+	Слабый рост по уколу	Нет изменений
M3	+	Поверхностный	Нет изменений
M4	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Нет изменений
M5	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Нет изменений
M6	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Нет изменений
M7	+	Поверхностный	Нет изменений
<i>21 сутки</i>			
M1	+	Поверхностный	Нет изменений
M2	+	Слабый рост по уколу	Нет изменений
M3	+	Поверхностный	Желатин текучий под колонией
M4	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Желатин текучий под колонией
M5	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Желатин текучий под колонией
M6	+	Преимущественно поверхностный, по уколу	Желатин текучий под колонией
M7	+	Поверхностный	Желатин текучий под колонией

По результатам данной работы для дальнейшего исследования активности синтеза протеаз были выбраны штаммы микромицетов M5 и M6.

Литература

1. Qasim F., Diercks-Horn S., Gerlach D., Schneider A., Fernandez-Lahore H.M. Production of a novel milk-clotting enzyme from solid-substrate *Mucor spp.* culture // Journal of Food Science, 2022, vol. 87, i. 10, pp. 4348–4362.
2. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии // Справочник. К.: Наукова думка, 1982. – 552 с.

Актинобактерии рода *Nocardiosis* – перспективные агенты биологического контроля фитопатогенов

Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Братилова Д.М.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева»,
lilyagrigoryan90@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38386

В текущем десятилетии потребление биопродуктов растет на 10–15% в год – в 3–5 раз быстрее, чем спрос на их синтетические аналоги. Как ожидается, в ближайшие 5 лет объем выпуска биопродуктов удвоится. Вместе с тем, производство и потребление биопродуктов в России остается незначительным, участники данного рынка недостаточно информированы о существовании и хозяйственной значимости этого направления [1, 4].

Целью исследования является создание нового для России экспериментального образца средства защиты растений на основе бактерий рода *Nocardiosis* с фитостимулирующими, фунгицидными, инсектоакарицидными, противовирусными и антиоксидантными свойствами.

Данный инновационный продукт позволит решить проблему распространения вирусных и грибных болезней растений, насекомых-вредителей с помощью природных механизмов подавления с использованием бактерий [2].

Конечными потребителями инновационной продукции могут быть аграрии, крестьянской фермерские хозяйства, крупные фирмы занимающиеся выращиванием сельской продукции, тепличные хозяйства, розничная продажа средства защиты растений в магазины. На данный момент нами заключены договоры и протоколы о намерениях на поставку нашего средства защиты растений с четырьмя крупными хозяйствами области и филиалом ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области.

Проведенный нами анализ целевого сегмента потребителей создаваемого продукта свидетельствует о высоком уровне платежеспособного спроса на 2021–2023 гг. Данный факт может быть подтвержден принятой в последние годы законодательной базой, призывающей к переходу на бесpestицидное производство и экологически чистую продукцию. Спрос на средство защиты растений в большей степени носит сезонный характер. И будет возрастать с начала мая до октября для производств, использующих выращивание овощей в открытом грунте. Для тепличных хозяйств работающих круглогодично, спрос будет постоянным. Поэтому, спрос населения может быть удовлетворен круглогодично, и не будет носить сезонный характер.

Исследуемый сегмент рынка имеет свои особенности, они связаны с оригинальными методами производства по предлагаемой технологии. На рынок можно выводить продукцию круглый год. Основной рынок сбыта – южные регионы России (Краснодарский и Ставропольский края, Волгоградская область). Планируемая доля на рынке в ЮФО всей продукции составляет до 10% отраслевого рынка, с дальнейшим увеличением до 15–20%. На российском рынке биологических средств защиты растений представлены около 20 производителей. Наиболее крупными являются ООО «ПО Сиббиофарм», ФГБУ «Российский сельскохозяйственный центр» («Россельхозцентр»), ООО «НВП «Башинком», ЗАО «Агробиотехнология». В Краснодарском крае функционирует ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений» (ВНИИБЗР).

Разрабатываемое новое уникальное полифункциональное средство защиты растений с фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными, антиоксидантными свойствами на основе бактерий

рода *Nocardiosis* должно повышать урожайность и потребительские свойства полученной сельскохозяйственной продукции [3, 5]. Выполнение проекта позволит оптимизировать способы получения и применения разрабатываемого средства защиты растений за счет снижения материальных затрат. Области применения средства защиты растений являются: сельскохозяйственная микробиология, агробиотехнология, растениеводство и защита растений.

Функции, которые должно выполнять средство: будет применяться в целях профилактики и борьбы с насекомыми-вредителями и патогенами растений грибной и вирусной природы; стимулировать рост и развитие растений; способствовать увеличению плодородия почвы; повышать урожайность и качество сельскохозяйственной продукции; являться экологически безопасным средством

Работа выполнена в рамках реализации проекта «Разработка экологически безопасного средства защиты растений на основе почвенных актинобактерий для восстановления агроэкосистем» по Программе развития Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева на 2021–2030 годы («Приоритет 2030»).

Литература

1. Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Курашов Е.А., Крылова Ю.В., Федорова Е.В., Явид Е.Я., Ходонович В.В., Яковлева Л.В. Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 172–178. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251: 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.25750/1995-4301-2021-3-172-178.
2. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Яковлева Л.В., Шляхов В.А. Микробиологический состав засоленных почв аридных территорий // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». 2018. № 12. С. 6–14.
3. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Шляхов В.А., Андреева Е.Д., Егоров М.А. Оценка биологической эффективности бактерий *Streptomyces* sp., выделенных из засоленных почв аридной зоны, в отношении возбудителей вирусных болезней картофеля // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». 2018. № 12. С. 14–22.
4. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Шляхов В.А. Биологическое обоснование применения суспензии штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM 04697 для защиты томата от насекомых – вредителей и фитопатогенов в открытом грунте // Естественные и технические науки. 2020. № 6 (144). С. 54–57.
5. Григорян Л.Н., Батаева Ю.В. Оценка эффективности применения почвенных актинобактерий на томатах в аридной зоне // Проблемы агрохимии и экологии. – 2021. – № 1. – С. 27–31.

Разработка инновационных биологических препаратов на основе природных штаммов рода *Bacillus*

Евдокимов И.Ю., Иркутова А.Н.

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», ИЦ «Промбиотех»,
ivan.evdokimov.92@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38387

Один из важных векторов при переходе к экологическому сельскому хозяйству направлен на массовое внедрение биологических препаратов для животноводства и растениеводства. При этом ризосфера – актуальный объект для выделения промышленно активных, природных штаммов. Природные штаммы обладают рядом преимуществ для промышленного производства биопрепаратов, позитивно отличающих их от генно-модифицированных, рекомбинантных, мутированных штаммов: востребованность их естественных ферментных систем из-за лучших качественных характеристик в условиях ферментации (например, при наработке большего количества биомассы за единицу времени); не очень требовательны к параметрам культивирования, количеству компонентов среды и содержанию специализированных

компонентов, определяющих индукцию необходимых целевых веществ. В связи с выше сказанным для разработки данной категории препаратов необходимо поддерживать и расширять коллекции микроорганизмов с высокой биологической активностью.

Коллекционные фонды – это материальная база для решения конкретных теоретических проблем, которые имеют практический выход. Ценность коллекций культур микроорганизмов как экспертных центров и депозитариев биологического материала и информации возрастает в значительной степени, определяя уровень развития биотехнологии как в конкретном регионе, так и в стране. В настоящее время коллекция микроорганизмов ИЦ «Промбиотех» АлтГУ насчитывает более 80 штаммов, из них около 60 бактерий, 6 дрожжей, 15 микроскопических грибов, 15 тест-культур и 1 фаг. Цель данного исследования: разработка биологических препаратов на основе природных ризосферных штаммов рода *Bacillus*, с технологически-ценными свойствами из коллекции инжинирингового центра.

Материалы и методы

Объекты исследования: штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516, выделен из ризосферы рода *Berteroa*; *B. pumilus* RCAM05517, из ризосферы р. *Rumex*; *B. pumilus* B-13250, из ризосферы р. *Cichorium*; *B. toyonensis* B-13249, выделенный из ризосферы р. *Helianthus*.

Питательные среды: L-бульон для получения посевного материала; инокуляционная для глубинного культивирования на основе пептона, дрожжевого экстракта и глюкозы; основная ферментационная на основе мелассы и кукурузного экстракта; криопротекторная, на основе желатина и сахарозы, для защиты клеток при лиофилизации; среда для контроля чистоты – Эндо.

Глубинное культивирование каждого штамма проводили в биореакторах объемом 15 и 250 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург). Для получения большего количества бактериальных концентратов ферментацию осуществляли в биореакторе объемом 250 л с ферментативной питательной средой, предварительно вырастив микробные культуры бацилл до стадии активного деления на вегетативной питательной среде в биореакторе на 15 л.

Целевым продуктом ферментации являлась биомасса спор бактерий, поэтому ее концентрировали путем центрифугирования. Процесс вели на проточной центрифуге GTGQ-1251 Tubular Centrifuge (Китай) при 15 000 об./мин в случае ферментации в 250 л биореакторе и на центрифуге SIGMA 4-16S/KS (Япония) в течение 20 мин при 4100 об./мин после культивирования бацилл в ферментере объемом 15 л.

После концентрирования биомассу смешивали с предварительно простерилизованной защитной средой, замораживали и отправляли в камеру лиофильной сушки SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55 (США) (250 л) или Epsilon 1-4 LSCplus (Германия) (15 л). Время сушки составляло около 40 ч, после чего биомассу извлекали, измельчали и проверяли на содержание влаги с помощью анализатора влажности MOC63u Shimadzu (Япония). Как правило, после 40 ч сушки содержание влаги в готовом концентрате было минимальным – менее 5%.

Для получения готового препарата использовали смеситель периодического действия типа «пьяная бочка», в котором сухой концентрат либо смешивали с наполнителем, в случае «Аквабациллина», либо мешались концентраты в определенном соотношении между собой для «Фитопумилина».

Результаты и обсуждения

Первым разработанным биопрепаратом ИЦ «Промбиотех» стал пробиотик для аквакультуры и животных «Аквабациллин (Aquabacillin)». В качестве действующего компонента выступил консорциум уникальных штаммов *Bacillus toyonensis* и *Bacillus pumilus* из коллекции центра. Титр бацилл в готовом препарате – не менее 1×10^{10} КОЕ/г. По прошествии первых промышленных испытаний пробиотический препарат зарекомендовал положительный эффект на процент выклева цист и больший выход биомассы артемии. Также выявлено, что пробиотик способствует более раннему выходу из личиночной стадии креветки *M. rosenbergii* по сравнению с контролем (на 18-й день). Дополнительно, выяснено, что разработанный пробиотик положительно сказывается и на гидрохимических показателях воды в системах УЗВ (Установка замкнутого водоснабжения) (Malkova et al., 2022). За время проведения всех регламентируемых производственных процедур и соответствующих испытаний установлен срок годности препарата, который составил не менее 12 месяцев, о чем свидетельствует сохранение титра и отсутствие посторонней микрофлоры. Можно подметить, что первые карантинные образцы

препарата по-прежнему проверяются на микробиологические показатели, и при соблюдении условий хранения, на настоящий момент также сохраняют исходные параметры (около 36 месяцев).

Вторым биологическим продуктом явилось средство защиты и стимулятор роста растений. Данный препарат содержит в своем составе 3 биосовместимых штамма в *B. pumilus*, предназначен для предпосевного протравливания семян, с уже известной дозировкой в 1 г сухого препарата на 10 кг семян. В лабораторных условиях установлена фунгицидная активность биопрепарата по отношению к таким фитопатогенам, как *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora* (Малкова и др., 2021). В 2021 г. проведен первый год полевых испытаний препарата на таких культурах, как подсолнечник, гречиха, рапс и овес. Было зафиксировано положительное влияние препарата на структуру урожая растений, в 2022 г. проведен 2-й год промышленных испытаний на полях АНИИСХ ФАНЦА. За период исследований определен срок годности препарата, который также составил не менее 12 месяцев, о чем свидетельствует сохранение титра и отсутствие посторонней микрофлоры. Первые карантинные партии сохраняют свои характеристики уже на протяжении 36 месяцев.

Таким образом исследование микроорганизмов и, прежде всего, тех, которые связаны с деятельностью человека, становится предметом разнообразных Российских и международных инициатив. Основными задачами коллекций микроорганизмов являются инвентаризация, сохранение и длительное использование биологических объектов из разных мест обитания. Кроме того, для сохранения активности и конкурентоспособности разработанных биопрепаратов возможна ротация штаммов из собственного коллекционного фонда. А это всегда расширяет возможности внедрения биотехнологических разработок в реальный сектор экономики.

Работа проведена при поддержке программы «Академическая мобильность» Алтайского государственного университета.

Литература

1. Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н. Изучение антагонизма ризосферных бактерий к *Phytophthora infestans* для создания средства защиты растений. Материалы IV межрегиональной научно-практической конференции (с международным участием) «От биопродуктов к биоэкономике» (23–26 сентября 2021 г.) – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2021. – С. 45–48.
2. Malkova A., Evdokimov I., Shirmanov M., Irkitova A., Dementyev D. New bacilli-based probiotic for aquaculture: efficacy study on *Macrobrachium rosenbergii*. BIO Web Conf. International Scientific and Practical Conference «Sustainable Development of Traditional and Organic Agriculture in the Concept of Green Economy» (SDGE 2021). Vol. 42, 2022. Ar. 01011. <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.1051/bioconf/20224201011>

Модели микробных сенсоров для исследования биохимических особенностей микроорганизмов

Емельянова Е.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,
elenvem@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38388

В микробных сенсорах в качестве распознающего элемента используют клетки различных микроорганизмов (культур-рецепторов). При использовании живых клеток реакция микробного сенсора на вводимое вещество может сопровождаться изменением дыхательной активности клеток культуры-рецептора. В этом случае в качестве преобразователя используют кислородный электрод, например, типа Кларка. Кислородный электрод типа Кларка преобразует химический сигнал (изменение концентрации кислорода) в электрический (изменение тока электрода). В зависимости от способа контакта меж-

ду микробными клетками и преобразователем различают два типа микробных сенсоров: реакторный биосенсор и мембранный биосенсор [1]. В Лаборатории биосенсоров ИБФМ РАН при проведении биотехнологических исследований были использованы лабораторные модели обоих микробных сенсоров с кислородным электродом типа Кларка в качестве преобразователя. В этих моделях отклик микробных клеток на введённое вещество (субстрат) сопровождался изменением дыхания микробных клеток, что было обусловлено изменением клеточного метаболизма. Поэтому лабораторные модели микробных сенсоров могли быть использованы не только для определения концентрации субстрата, с какой целью изначально использовали микробные сенсоры, но и для оценки начальных этапов метаболизма субстрата в клетках культуры-рецептора.

В настоящем сообщении представлены обобщённые данные о возможности использования лабораторных моделей микробных сенсоров для исследования биохимических особенностей культур-рецепторов, на основе которых были сформированы биосенсоры.

Основой распознающего элемента в использованных моделях были клетки различных микроорганизмов: как бактерий [2, 3], в то числе актинобактерий [4], так и дрожжей [5] или мицелиальных грибов [2, 3].

Применяя биосенсорный подход, был определён уровень дефицита магния при выращивании дрожжей *Candida ethanolica*. Кроме того было показано наличие у культуры разных систем для транспорта ионов ди- и трёхвалентного железа в клетки *C. ethanolica* [5].

Модели как реакторного, так и мембранного биосенсоров применяли для изучения отклика клеток бактерий *Pseudomonas B-4c/3* на мальтозу [2]. Наличие отклика интактных неиндуцированных клеток (бактерии были выращены на среде, не содержащей субстрат) на мальтозу, свидетельствовало о том, что клетки культуры B-4c/3 содержали конститутивные ферменты, инициировавшие метаболизм мальтозы, которые определяли отклик бактериальных клеток на этот субстрат. Присутствие различных ферментных систем в клетках бактерий B-4c/3 и мицелиальных грибов *Mucor F-6/2* позволяло обнаруживать мальтозу в присутствии крахмала (мальтозный сироп получают при гидролизе крахмала).

Лабораторные модели мембранных биосенсоров были сформированы на основе клеток мицелиальных грибов *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Coll или бактерий *Bacillus subtilis* 128 [3]. Помимо определения содержания фузариевой кислоты (ФК) в водных растворах, с помощью моделей были определены биохимические константы, характеризующие воздействие фузариевой кислоты на клетки культур-рецепторов: пороговая концентрация субстрата (550 мг/л), вызывающая ингибирование культуры, – для обоих микроорганизмов и константа торможения субстратом (1100 мг/л) – для гриба. Как показал анализ полученных зависимостей, поступление ФК в неиндуцированные клетки культур-рецепторов происходило путём простой диффузии (пассивный транспорт): липофильные соединения диффундируют через липидный слой мембраны без затрат энергии. После инкубации бактериальных клеток в присутствии ФК, возможно, происходила индукция белков-транспортёров, опосредующих диффузию (факультативная диффузия) кислоты в микробные клетки. Кроме того, наблюдали индукцию ферментных систем, инициирующих метаболизм кислоты. Средство к ФК для систем, определяющих отклик клеток на кислоту, значительно повышалось после индукции (константа полунасыщения изменялась с 169 до 8 мг ФА/л).

В результате исследования биохимических особенностей клеток актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* с помощью модели микробного сенсора, сформированного на основе этих бактерий, были обнаружены следующие особенности отклика актинобактерий на 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) [4]. Классическая зависимость отклик-концентрация была получена при концентрациях динитрофенола выше $1 \cdot 10^{-4}$ М. Динитрофенол в низких концентрациях (в диапазоне от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-12}$ М) не был способен генерировать отклик биосенсора. Однако было установлено, что низкие концентрации 2,4-ДНФ активируют эндогенное дыхание *R. erythropolis*. Поэтому клетки актинобактерий с высоким уровнем эндогенного дыхания были чувствительны к концентрациям 2,4-ДНФ $1 \cdot 10^{-5}$ М и ниже. Была предложена методика «соокисления», когда отклик клеток на экзогенный субстрат, $1 \cdot 10^{-3}$ М этанола, фиксировали в присутствии динитрофенола в концентрации ниже $1 \cdot 10^{-5}$ М (одновременное внесение этанола и 2,4-ДНФ). Этанол служил истинным субстратом дыхания для клеток культуры-рецептора, а следовые количества динитрофенола стимулировали перенос электронов по дыхательной цепи. В результате отклик бактериальных клеток на этанол увеличивался на 80% в присутствии $1 \cdot 10^{-6}$ М динитрофенола, на

100% – при $1 \cdot 10^{-7}$ М, на 50% – при $1 \cdot 10^{-8}$ М и на 20% – при $1 \cdot 10^{-12}$ М. По степени стимуляции отклика на этанол можно было судить о содержании 2,4-ДНФ.

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что биосенсорный подход (использование лабораторных моделей микробных сенсоров, сформированных на основе микробных клеток, подлежащих исследованию) удобный в использовании экспресс метод исследования биохимических особенностей микробных культур, используемых в качестве культуры-рецептора биосенсора.

Литература

1. Racek J. Cell-Based Biosensors. Lancaster, Basel: Technomic Publishing Company, 1995. – P. 13–14.
2. Emelyanova E.V. Biosensor for maltose quantification and estimation of maltase activity // Advances in Biochips. – 2019. – Vol. 1. – P. 2–11.
3. Emelyanova E.V.; Antipova, T.V. Biosensor approach for electrochemical quantitative assessment and qualitative characterization of the effect of fusaric acid on a culture-receptor. // Journal of Biotechnology. – 2022. – Vol. 357. – P. 1–8.
4. Емельянова Е.В. Метод соокисления для биосенсорного определения низких концентраций 2,4-динитрофенола в воде. / Питьевая вода в XXI веке. Материалы научно-практической конференции с международным участием (Иркутск, 23–28 сентября 2013 г.) – Иркутск: Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2013. – С. 30–33.
5. Emelyanova E.V. Relationship between magnesium and iron uptake by the yeast *Candida ethanolica* // Process Biochemistry. – 2001. – Vol. 36. – P. 517–523.

Синтез гуминовых веществ лакказой, иммобилизованной на почвенных минералах

Заварзина А.Г., Демин В.В., Белова О.В., Леонтьевский А.А., Лисов А.В.

¹ Московский государственный университет (Факультет почвоведения)

² ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
ssl208@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38389

Гуминовыми веществами (ГВ) называют совокупность гетерогенных и полидисперсных соединений, образующихся при трансформации органических остатков в почвах и других природных средах. Роль окислительных реакций конденсации (вторичного синтеза) под воздействием ферментов в образовании ГВ является предметом дискуссий. Был проведен синтез ГВ ферментом лакказой в модельных условиях – иммобилизация фермента на почвенных минералах, низкая концентрация фенольных соединений. Изучена возможность синтеза ГВ из мономеров в динамических условиях и при низких концентрациях веществ в присутствии лакказы гриба *Coprinus comatus* ВКМ F-2940. Лакказу иммобилизовывали на каолините, модифицированном гидроксидом алюминия. Исследованы некоторые свойства фермента, субстратная специфичность в отношении фенольных кислотпредшественников ГВ, влияние природы аминокислот на способность к образованию комплексов с фенольными кислотами в присутствии лакказы. При иммобилизации лакказы рН оптимум с 2.6-диметоксифенолом (2.6-ДМФ) смещался с рН 6.0 в кислую область (рН 4.4), уменьшалась термостабильность фермента, кинетические параметры окисления 2.6-ДМФ не менялись. По реакционной способности (процент конверсии кислот свободной лакказой) индивидуальные фенольные кислоты образовывали ряд: кофейная (72) > феруловая (53) > галловая = сиреневая (43) > протокатеховая (5.5) >> ванилиновая = п-гидроксибензойная (0). В смеси кислот наиболее эффективно окислялась галловая кислота (50%), остальные кислоты в сопоставимых количествах (13–17%). Конверсия фенольных кислот в их смеси увеличивалась в присутствии лизина.

При пропускании смеси галловой, протокатеховой, сиреневой, феруловой кислот (0.01 мМ каждой) и лизина (0.02 мМ) через проточную микроколону иммобилизованная лакказа эффективно окисляла фенольные кислоты, продукты реакции связывались с минеральной фазой, окрашивая ее в темный цвет. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии молекулярные массы веществ, экстрагированных с поверхности минерала, составляли 270–900 Да, то есть образовывались низкомолекулярные вещества типа фульвокислот. Установлена важная роль свободнорадикальных гетерофазных реакций в формировании молекулярного состава жидкой фазы и органо-минеральных комплексов.

Микробное сообщество донных отложений р. Упа, находящейся в зоне поражения ЧАЭС, и его роль в образовании биогеохимического барьера

Зеленина Д.А.¹, Артемьев Г.Д.¹, Соболев Д.А.³, Кузьменкова Н.В.^{3,4}, Сафонов А.В.¹

¹ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
zelenina_darya_soboleva@mail.ru

² Институт проблем безопасного развития атомной энергетики, Москва

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва

⁴ Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38390

Загрязнение водоемов радионуклидами при аварийных ситуациях на АЭС и предприятиях ЯТЦ создает высокие риски их включения в пищевые цепи. В естественных условиях при радионуклидном загрязнении в водоемах с высокой продуктивностью в летний период может происходить самоочистка водоема за счет аккумуляции радионуклидов при интенсивном развитии фитопланктона и его последующей седиментации в донные отложения. Эффективность иммобилизации радионуклидов в донных отложениях определяется особенностями биогеохимических процессов в донных отложениях, в первую очередь интенсифицируемых микроорганизмами цикла азота и серы. Известно, что, при развитии анаэробных микроорганизмов, восстанавливающих сульфат-ионы или трехвалентное железо, формируются малорастворимые осадки пирротина ($\text{Fe}_2\text{Sn}_2\text{S}_3$), троилита (FeS) и гидротроиллита ($m\text{FeS} \cdot n\text{Fe}(\text{OH})_2$). Рост аэробных бактерий может приводить к образованию ферригидрита ($m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), гётита (FeOOH) и др. осадков, способствующих минерализации актинидов.

Продуктивность водоема и интенсивность биогеохимических процессов в донных отложениях может быть активирована путем внесения различных соединений, содержащих биофильные элементы. Понимание процессов биогеохимического минералообразования в донных отложениях и их роли в иммобилизации радионуклидов, а также поиск способов для управления ими, может стать важным этапом развития новых эффективных подходов для очистки водоемов с радионуклидным загрязнением.

Целью данной работы была оценка участия микробного сообщества донных отложений в формировании биогеохимического барьера для радионуклидов на примере проб, отобранных в заводи реки Упа в Тульской области, подвергшейся загрязнению при аварии на ЧАЭС в 1986 г.

В результате оценки разнообразия микробного сообщества ила реки Упа на основании анализа генов 16S рРНК были обнаружены сульфатвосстанавливающие бактерии порядка *Desulfobacterota* (20%). Представители филума *Firmicutes* (среди которых известны сульфатредукторы родов *Desulfotomaculum*, *Desulfosporomusa*, *Desulfosporosinus*, *Thermodesulfobium*) составляли 12% сообщества. Ряд представителей *Alfaproteobacteria* (9%) также способны к диссимиляционной и ассимиляционной сульфатредукции. *Gamma*proteobacteria (19%) включает бактерии цикла серы, среди которых *Thiomonas*, *Thiobacillus*, *Sulfuritalea*. В пробах обнаружены представители бактерий рода *Pseudomonas*, известные своими большим спектром возможностей использования неорганических акцепторов электронов, включая нитрат, арсенат, уранил, селенат. Лабораторные эксперименты показали, что при добавлении сульфатов к про-

бе ила через неделю наблюдали снижение редокс потенциала в восстановительную область и образование характерного черного осадка. При анализе исследуемых илов методом сканирующей электронной микроскопии было обнаружено образование биогенных осадков различного вида, например, микрокристаллов сульфида железа (пирита, пиротина).

Термодинамическое моделирование процессов в системе ила показало, что микробные процессы способствуют формированию новых нерастворимых минеральных фаз железа, плутония и урана. Формирование железистых фаз в донных отложениях типа пирита, вюрцита и гидротроиллита приведет к формированию осадительно-сорбционного биогенного минерального барьера.

Таким образом, микробные процессы в донных отложениях приводят к формированию осадительно-сорбционного биогенного-минерального барьера, эффективно иммобилизующего актиниды. Образование восстановительных условий в донных отложениях является ключевым механизмом в формировании барьера для актинидов. Важнейшим фактором является образование биогенных сульфидно-железистых минеральных фаз, формирующих основной материал барьера.

Пределы выносивости растений-мелиорантов, инокулированных эндотрофными микромицетами *Neonectria macrodidyma* и *Fusarium tricinctum*, к различным концентрациям нефти в субстрате

Исупова А.А., Бухарина И.Л.

ФГБОУ «Удмуртский государственный университет»
(Институт гражданской защиты, Кафедра инженерной защиты окружающей среды),
isupova.anastasiya.96@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38391

Нефть является одним из самых востребованных полезных ископаемых. По добыче нефти Российская Федерация занимает второе место в мире. В Удмуртской Республике добывается свыше 10 млн т нефти в год. В нефтедобывающих регионах РФ, в том числе и в УР, при транспортировке нефти территории могут загрязнены. Также причинами загрязнения грунтов могут быть техническое обслуживание, разливы нефти и нефтепродуктов. Существует проблема поиска наиболее эффективных и безопасных методов восстановления нефтезагрязненных земель, к которым относится биотехнологический метод с использованием микропрепаратов-нефтедеструкторов. Но действие биопрепаратов ограничено и связано с условиями среды. В настоящее время идет поиск биологических агентов, которые повысили бы эффективность биопрепаратов или могли их заменить. Такими агентами могут быть микроскопические грибы [1–3]. Поэтому был заложен лабораторный эксперимент с целью изучения влияния инокуляции фитомелиорантов эндотрофными микромицетами на биохимические показатели растений-мелиорантов и содержание нефти в субстрате.

Объекты и методы исследований

Использовали контейнеры 17×13×15 см, имитируя тем самым 15 см слой земли. В качестве субстрата использовали кокосовую стружку и песок в соотношении 3:1. В результате масса субстрата в воздушно-сухом состоянии составила 300 г. Затем влажность субстрата довели до 60%, масса субстрата составила 820 г. Далее рассчитывали необходимое количество нефти для внесения в субстрат, соответствующее 1%, 5% и 10% нефтезагрязнению по отношению к сухой массе. После внесения нефти, субстрат тщательно перемешивали для равномерного распределения нефти в нем. В контейнеры с 1%, 5% и 10% нефтезагрязнением, в трехкратной повторности, производили посев семян газонной травы (овсяница луговая 50%, мятлик луговой 50%) с нормой высева 50 г/м². После прорастания семян вносили суспензии эндотрофных грибов *Neonectria macrodidyma* или *Fusarium tricinctum* по 30 мл в каждый контейнер. Исследуемые изоляты микромицетов были выделены из корней древесных растений, произрастающих

на территории г. Ижевска. Суспензию грибов готовили согласно патенту на изобретение №2722206 от 28.05.2020 г. Поливали растения дистиллированной водой по 30 мл 2 раза в неделю. Опыт проводили в условиях климатической камеры с температурой днем – +22 °С, ночью – +18 °С и продолжительностью светового дня – 12 часов. Через 4 месяца после начала эксперимента отбирали надземную часть растений для определения биохимических показателей и субстрат для определения количества нефти. Измерения концентрации нефти проводили с помощью концентратомера АН-2 по стандартным методам ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 [4].

Результаты исследований

Результаты биохимических исследований приведены в табл. 1. Содержание фотосинтетических пигментов, сухого вещества и аскорбиновой кислоты в надземной части растений-мелиорантов, инокулированных микромицетами.

Таблица 1

Варианты опыта	Содержание фотосинтетических пигментов, мл/л			Содержание сух.вещ.,%	Содержание аскорб. к-ты, мг%
	хлорофилл а	хлорофилл b	каротиноиды		
Контроль (р+N)	2,23±0,12*	0,84±0,05	3,64±0,09	17,20±4,25	85,54±16,47
	2,11...2,35**	0,79...0,88	3,53...3,75	12,10...20,80	58,82...115,61
P+N; 1%	1,8±0,4	0,66±0,14	3,02±0,45	22,12±2,61	55,92±4,01
	1,45...2,21	0,52...0,83	2,47...3,64	20,00...25,90	47,9...60,00
P+N; 5%	1,37±0,34	0,51±0,13	2,33±0,58	24,52±1,66	65,84±10,42
	1,03...1,75	0,38...0,65	1,75...2,99	21,30...27,17	47,71...83,83
P+N; 10%	1,54±0,29	0,57±0,05	2,63±0,02	28,11±17,74	77,66±9,23
	1,25...1,81	0,46...0,68	2,14...3,09	10,00...43,00	65,61...95,81
Контроль (р+F)	1,19±0,16	0,43±0,06	2,03±0,25	17,77±0,57	27,80±3,95
	1,03...1,36	0,37...0,49	1,77...2,31	17,00...18,33	23,81...35,71
P+F; 1%	1,29±0,14	0,47±0,05	2,17±0,19	18,20±2,33	31,93±4,06
	1,17...1,46	0,42...0,53	1,98...2,46	16,60...21,00	23,81...36,14
P+F; 5%	1,35±0,07	0,49±0,03	2,27±0,09	16,37±1,13	55,63±4,00
	1,29...1,43	0,47...0,53	2,19...2,37	15,40...16,90	47,62...59,76
P+F; 10%	0,99±0,07	0,32±0,07	1,70±0,13	19,33±0,43	35,85±0,08
	0,87...1,07	0,26...0,39	1,54...1,82	19,00...19,80	35,71...36,00

Примечание. P – растение-мелиорант, N – *Neonectria macrodidyma*, F – *Fusarium tricinctum*, * – среднее значение показателя ± стандартное отклонение; ** – доверительный интервал для среднего значения при $p < 0,05$.

Во-первых, проанализировали влияние инокуляции эндотрофным грибом *Neonectria macrodidyma* на биохимические показатели растений-мелиорантов. При концентрации нефти 1% достоверных различий по содержанию фотосинтетических пигментов не наблюдалось. Достоверное снижение фотосинтетических пигментов наблюдалось при концентрации нефти от 5% до 10%. По содержанию аскорбиновой кислоты достоверных различий не наблюдалось, что может свидетельствовать об отсутствии активации антиоксидантной системы на стрессовый фактор. Это может указывать на то, что эндотрофный гриб мог взять функцию нейтрализации нефтезагрязнения на себя. Во-вторых, проанализировали влияние инокуляции эндотрофным грибом *Fusarium tricinctum* на биохимические показатели растений-мелиорантов. Достоверное снижение фотосинтетических пигментов наблюдалось при 10% нефтезагрязнении. По содержанию аскорбиновой кислоты достоверное увеличение уже наблюдалось при 1% нефтезагрязнении и, с увеличением количества нефти, содержание аскорбиновой кислоты также возрастало. Результаты данных наблюдений связаны с активацией ферментной системы, так как аскорбиновая кислота используется растениями для нейтрализации загрязнений.

Результаты измерения концентрации нефти в субстрате показали эффективность инокуляции фитомелиорантов эндотрофным микромицетом *Neonectria macrodidyma*. В опытных вариантах с 5% и 10%

нефтезагрязнением наблюдалось достоверное снижение количества нефти в 2 раза. А при 1% нефтезагрязнении количество нефти достоверно снизилось в 3 раза по сравнению с контролем и составило менее 1000 мг/кг, что является допустимым значением по ГОСТ. При инокуляции фитомелиорантов эндотрофным микромицетом *Fusarium tricinctum* достоверного снижения количества нефти не наблюдалось.

Выводы

Данные результаты указывают на разный эффект инокуляции растений-мелиорантов микромицетами *Neonectria macrodidyma* и *Fusarium tricinctum*. Микромицет *Neonectria macrodidyma* способствует снижению концентрации нефти в субстрате, а *Fusarium tricinctum* способствует повышению устойчивости фитомелиорантов к нефтезагрязнению.

Литература

1. Рябов В.Д. Химия нефти и газа: учебное пособие. – М.: ИД «ФОРУМ». 2009. С. 336.
2. Лямзин В.И., Бухарина И.Л., Здобяхина О.В., Исламова Н.А., Загребина В.С., 2018. № 3 (45). С. 94–98.
3. Bukharina I., Franken Ph., Kamasheva A., Vedernikov K., Islamova N. (2016). About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. Т. 7. № 4. С. 1386–1394.
4. ГОСТ Р 54039-2010. Экспресс-метод спектроскопии в ближней инфракрасной области для определения содержания нефтепродуктов.

Протопластирование и мутагенез грибной культуры *Gibberella zeae* VKM F-2600: получение активных продуцентов урсодезоксихолевой кислоты

Комеров В.В., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
svkollerov@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38392

Урсодезоксихолевая кислота (3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановая кислота, УДХК) – стероидное соединение холанового ряда, относится к так называемым вторичным желчным кислотам и образуется из первичных кислот (холевой и хенодезоксихолевой) кишечными бактериями (Prabha and Ohri 2006; Begley et al.2005). УДХК занимает особое место среди желчных кислот благодаря своим ценным терапевтическим свойствам, находя широкое применение в медицине для растворения камней в желчном пузыре, лечения и профилактики холестаза, склерозирующего холангита, гепатита и цирроза печени, а также других заболеваний в гастроэнтерологии и гепатологии (Philipp 2011).

В настоящее время промышленное производство УДХК основано на многоступенчатом, экологически небезопасном химическом синтезе из холевой кислоты, выделенной из желчи крупного рогатого скота. Синтез требует нескольких стадий защиты и снятия защиты гидроксильных групп, при этом общий выход УДХК не превышает 30% (Tonin and Arends 2018).

Мицелиальные грибы являются хорошо известными биокатализаторами регио- и стереоспецифического гидроксирования стероидов. Ранее мы провели широкий скрининг грибных культур на наличие 7 β -гидроксилазной активности в отношении литохолевой кислоты (ЛХК) с возможностью синтеза УДХК. Аскомицет *Gibberella zeae* VKM F-2600 был выбран в качестве наиболее перспективного штамма, продуцирующего до 30% УДХК из ЛХК (1 г/л). Дальнейшая оптимизация условий биоконверсии обеспечила трехкратное увеличение выхода УДХК, однако при увеличении концентрации ЛХК до

2–4 г/л наблюдалась значительное (в 1.5 раза) снижение эффективности производства УДХК (Kollerov et al., 2013).

Добиться повышения показателей биоконверсии возможно за счет улучшения свойств грибного штамма путем мутагенеза. Устойчивость к азольному фунгициду кетоконазолу, ингибитору синтеза ферментов цитохрома P450 (CYP) может быть использована в качестве селективного маркера. Мутация в гене, кодирующем синтез грибной гидроксилазы может привести к его суперэкспрессии, обеспечивая устойчивость грибных клеток к кетоконазолу.

Основным препятствием для успешного мутагенеза мицелиальных грибов часто является низкая эффективность действия мутагенных факторов на клетки мицелия из-за сложной структуры клеточной стенки. Выходом является использование протопластов, которые представляют единичные клетки, утратившие клеточную стенку и окружённые только цитоплазматической мембраной, являясь удобным объектом для воздействия мутагенных факторов и селекции полученных мутантных клонов.

Целью настоящего исследования являлось повышение продуктивности штамма *Gibberella zeae* VKM F-2600 в синтезе УДХК путём разработки процедуры протопластирования, мутагенеза и регенерации протопластов с последующим скринингом и отбором мутантных клонов, обладающих повышенной β -гидроксилазной активностью в отношении ЛХК.

В ходе работы были определены ключевые параметры, влияющие на получение и регенерацию протопластов *G. zeae*, включая состав среды, возраст мицелия, выбор осмотического стабилизатора, концентрацию литических ферментов и время их воздействия на клетки мицелия.

Максимальный выход протопластов был получен из мицелия, выращенного на глюкозосодержащей среде с дрожжевым экстрактом. Добавление в качестве источника углерода сахарозы вместо глюкозы, также как и отсутствие в среде дрожжевого экстракта имело негативный эффект на выход протопластов. Использование же мицелия, выращенного на питательных средах, обогащенных пептоном или соевой мукой, приводило к значительному снижению количества образуемых протопластов, вероятно, вследствие изменения качественного состава клеточной стенки мицелия. Выход протопластов также зависел от возраста мицелия: наиболее продуктивным являлось использование находящегося в фазе активного роста 18 часового мицелия. При использовании более молодого мицелия (15 ч роста), также как и мицелия более поздних часов роста (24, 48 ч), характеризующегося нарастающей дифференциацией популяции, выраженной в увеличении частоты образования перегородок в гифах и появлении спорных клеток с утолщенной клеточной стенкой приводило к снижению выхода протопластов. Выбор осмостабилизатора и его концентрации в значительной степени определяли сохранение целостности образуемых протопластов и их регенерацию: использование NH_4Cl в концентрации 1М обеспечивало максимальное накопление протопластов, тогда как 1М сахароза способствовала лучшей частоте их регенерации ($\geq 9\%$). Кроме того, была установлена оптимальная концентрация комплекса литических ферментов из *Trichoderma hurzanium* (7,5 мг/мл) и продолжительность его воздействия на клетки мицелия (5 мин), обеспечивающие максимальный (до $0,6 \times 10^5$ /мл) выход протопластов *G. zeae*.

Изучение влияния различных концентраций кетоконазола на жизнеспособность протопластов *G. zeae* показало, что при концентрации фунгицида 70 μM в твердой среде регенерации протопластов не происходит. Исходя из этого, данная величина была принята в качестве минимальной ингибирующей концентрации (МИК). УФ облучение протопластов *G. zeae* позволило установить, что продолжительность воздействия мутагенным фактором в течение 3.5–4 мин обеспечивает выживаемость 6–12% клеток, что является оптимальным для получения наибольшего количества клеток с возможными мутациями. Воздействие УФ облучения в течение 6 мин и более приводило к полному ингибированию жизнеспособности протопластов и их регенерации на твердой питательной среде не наблюдалось.

Подобранные оптимальные условия получения протопластов, их мутагенеза и регенерации позволили получить 27 кетоконазол устойчивых мутантных клонов, биокаталитический потенциал которых был исследован в отношении ЛХК (4 г/л). Результаты скрининга показали, что три мутантных штамма: M13, M20 и M23 характеризуются повышенной β -гидроксилазной активностью в отношении ЛХК с синтезом на 10–30% больше УДХК по сравнению с родительским штаммом. Один из мутантов (M18), напротив, отличался слабой трансформационной активностью в отношении ЛХК, продуцируя на 20% меньше УДХК. Мутантный штамм *G. zeae* M23, выдерживающий концентрацию кетоконазола до 110 μM , проявлял максимальную β -гидроксилазную активность в отношении ЛХК (4 г/л), селективно продуцируя до 90% УДХК, что на 28% превышало показатели родительского штамма.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод, основанный на генерации протопластов, УФ-мутагенезе и отборе мутантных клонов, устойчивых к кетоконазолу, позволяет улучшить стероид гидроксилазную активность мицелиальных грибов и открывает перспективы эффективного микробиологического синтеза ценной желчной кислоты УДХК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 21-64-0024).

Литература

1. Prabha V., Ohri M. (2006) Bacterial transformation of bile acids. World J Microbiol Biotechnol 22:191-196.
2. Begley M., Gahan C.G., Hill C. (2005) The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol Rev 29:625–651.
3. Philipp B. (2011) Bacterial degradation of bile salts. Appl Microbiol Biotechnol 89:903–915.
4. Tonin F., Arends I. (2018) Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. Beilstein J Org Chem 14:470–483.
5. Kollerov V.V., Monti D., Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Ferrandi E.E., Larovere A., Gulevskaya S.A., Riva S., Donova M.V. (2013) Hydroxylation of lithocholic acid by selected actinobacteria and filamentous fungi. Steroids 78:370-8.

Деструкция фунгицида карбендазима иммобилизованными актинобактериями *Rhodococcus*

Кувичкина Т.Н., Капарулина Е.Н., Доронина Н.В., Решетилов А.Н.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
kuv@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38393

Карбендазим (метил-1Н-бензимидазол-2-ил карбамат) представляет собой бензимидазольный фунгицид системного действия, используемый против широкого спектра грибковых заболеваний сельскохозяйственных культур [1]. При длительном использовании этот фунгицид накапливается и обнаруживается в почве и сельскохозяйственных продуктах. Для его удаления могут быть использованы микроорганизмы-деструкторы карбендазима. Показано, что ряд штаммов родококков, а именно, *Rhodococcus erythropolis* CB11 [2], *Rhodococcus erythropolis* djl-11 [3], *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 [4], *Rhodococcus qingshengii* djl-6 [5] деградируют карбендазим. Посевом культуры на среды с карбендазимом в качестве источника углерода и азота можно найти деструктор. Однако, для этого требуются значительные затраты по времени. Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов позволяет значительно сократить время оценки.

Целью работы являлась проверка возможности использования амперометрического подхода при поиске микроорганизмов деструкторов карбендазима. Проверку проводили с 8 штаммами родококков, имеющихся в коллекции лаборатории изотопов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН:

1. *Rhodococcus erythropolis* S 67,
2. *Rhodococcus imtechensis* IEGM 940^T,
3. *Rhodococcus qingshengii* GL Mm 1,
4. *Rhodococcus koreensis* 962^T,
5. *Rhodococcus opacus* IEGM 716^T,
6. *Rhodococcus ruber*,
7. *Rhodococcus wratisloviensis* ВКМ Ас-2782,
8. *Rhodococcus wratisloviensis* IEGM 1112^T.

Культуры выращивали на агаризованной среде ГКА (глюкозо-картофельный агар, 10 г глюкозы, 18 г агара, 300 мл картофельного настоя, 700 мл дистиллированной воды) в течение 2–5 суток при темпера-

туре 28 °С. биомассу смывали 50 мМ калий-фосфатным буфером, рН 7,1. Далее биомассу отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 3 мин. Клетки иммобилизовали методом физической адсорбции на носитель GF/A (хроматографическая бумага) Измерения проводили в открытой кювете объемом 2 мл в 50 мМ калий-фосфатным буфере (рН 7,1), насыщенном кислородом, при комнатной температуре. Для регистрации измерений использовали потенциостат IPC-Micro («Кронас», Россия). Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потреблённого кислорода (сигнал биосенсора).

Показали, что иммобилизованные клетки (ИМК) штамма актинобактерий *Rhodococcus qingshengii* GL Mm 1, выделенного из глины Мертвого моря (Израиль), обладают наибольшей способностью деградировать карбендазим. Представлена градуировочная кривая зависимости ответа от концентрации карбендазима. При изучении влияния значений рН показано, что щелочные значения рН более предпочтительны, чем кислые значения. Биорецептор регистрировал ответы при высоких концентрациях хлористого натрия (до 500 мМ). Возможно, это связано с тем, что Мертвое море является самым соленым в мире, с соленостью около 34%. Проведена оценка субстратной специфичности биорецептора на основе штамма *Rhodococcus qingshengii* GI Mm 1 по следующим субстратам: катехол, фруктоза, арабит, глюкоза, сорбит, целлобиоза, метиламин, диметиламин. Долговременная стабильность, характеризующая устойчивость работы сенсора в течение длительного периода времени, составляла 14 суток. Длительность единичного измерения, включающая в себя время развития сигнала и время восстановления активности рецепторного элемента (отмывки сенсора) составляла 20 мин.

Таким образом, из восьми исследованных штаммов родококков отобран иммобилизованный штамм актинобактерий *Rhodococcus qingshengii* GL Mm 1, для которого показана возможность регистрации деструкции фунгицида карбендазима амперометрическим методом.

Литература

1. Chen Y., Zhou M.G. / Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399–19 // *Phytopathology*. 2009. Vol. 99. P. 441–446.
2. Holtman M.A., Kobayashi D.Y. Identification of *Rhodococcus erythropolis* isolates capable of degrading the fungicide carbendazim // *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997. Vol. 47. P. 578–582. 3. Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11 / Zhang X., Huang Y., Harvey P.R., Li H., Ren Y. 2013. *PLoS One* 8. P. 1–6.
4. *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility / Wang Z., Xu J., Li Y., Wang K., Wang Y., Hong Q., Li W.J., Li S.P. // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010. Vol. 60. P. 378–381.
5. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium / Xu J., He J., Wang Z., Wang K., Li W.J., Tang S.K., Li S.P. // *Int J Syst and Evol Microbiol*. 2007. Vol. 57. P. 2754–2757.

Использование эндофитных штаммов бактерии *Bacillus subtilis* для повышения эффективности фиторемедиации

Курамшина З.М.¹, Саттарова Л.Р.¹, Максимов И.В.²

¹Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Стерлитамак, kuramshinaz_zilya@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38394

Загрязнение почвы нефтью является одной из важных экологических проблем в настоящее время. Утечка нефти может произойти во время ее добычи, транспортировки, использования или утилизации, в результате чего она может попасть как водную, так и наземную среду. Загрязнение окружающей сре-

ды нефтью опасно из-за липофильного, мутагенного и канцерогенного действия ее компонентов. Когда почва загрязнена нефтью, перенос жидкости и диффузия воздуха в пористых пространствах почвы затруднены, что изменяет физические и химические свойства почвы и сильно влияет на функциональность экосистем. Некоторые чувствительные автохтонные микробы быстро погибают или подавляются компонентами нефти, что снижает устойчивость микробного сообщества. Токсические эффекты нефти проявляются и на растениях, нарушая, в частности, физиолого-биохимические процессы в тканях, связанные со снижением поступления питательных веществ и воды. Без функционального микробного сообщества и здоровой растительности окружающая среда вряд ли сможет поддерживать формы жизни более высокого порядка [1].

Восстановление окружающей среды, загрязненной нефтью, возможно с помощью физических и химических методов, но они имеют множество ограничений (методы дорогие, работают только с определенными органическими соединениями, не всегда приводят к полному разложению загрязняющих веществ; не являются экологически безопасными и др.). С другой стороны, такой биологический метод, как фиторемедиация, основанный на сотрудничестве растений и микробов, является многообещающей стратегией восстановления почв, загрязненных нефтепродуктами. Фиторемедиация требует меньше усилий по техническому обслуживанию, сводит к минимуму нарушения участка и является экономически эффективным и менее разрушительным подходом. Растения, благодаря своим экссудатам, разнообразию метаболитов и ферментативному механизму, могут адаптироваться и смягчать стрессовые условия, обусловленные присутствием углеводов в почве. Однако рост растений и производство биомассы часто ограничены в таких суровых условиях, и впоследствии эффективность фиторемедиации снижается, а гибель растений увеличивается. Ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), можно использовать для усиления роста растений в стрессовых условиях, тем самым повышая эффективность фиторемедиации. PGPR могут облегчить стресс у растений и снизить фитотоксичность углеводов с помощью многих механизмов, таких как снижение дефицита питательных веществ в почве (фиксация азота, растворение фосфора и усиление усвоения железа), синтез гормонов, стимулирующих рост растений, подавление выработки этилена, а также в силу их путей разложения загрязняющих веществ и метаболической активности [2].

Целью работы было исследовать влияние предпосевной обработки семян растений *Bromopsis inermis* (L.) эндофитными штаммами *Bacillus subtilis* на физиолого-биохимические показатели в условиях нефтяного загрязнения. В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* шт. 26Д (10^6 кл/мл) (коллекция ВНИИСХМ, № 128). Инокулированные и контрольные семена выращивали в вегетационных сосудах (при температуре 18–20 °С). Нефть вносили в концентрации 1, 10 и 50 г/кг почвы. Анализ физиолого-биохимических показателей проводили на 30 сутки.

В результате проведенных исследований показано, что у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д растений *B. inermis*, выросших в чистой почве, длина надземной части была больше на 12%. Наличие в почве нефти в концентрации 1 г/кг почвы стимулировало рост растений, как обработанных, так и необработанных бактериями. Выявленный ростстимулирующий эффект небольших концентраций токсикантов согласуется с данными литературы. Известно, что некоторые токсиканты в низких концентрациях могут стимулировать, а в высоких оказывать негативное действие на рост растений [3]. При дальнейшем увеличении концентрации нефти в почве (10 и 50 г/кг) наблюдали угнетение роста растений. Вместе с тем, обработанные бактериями растения, в таких условиях росли лучше необработанных при всех исследованных концентрациях нефти.

Нефть вызывает у растений множество разнообразных физиологических и биохимических повреждений. Компоненты нефти способствуют развитию окислительного стресса, прямо или косвенно повышая уровень активных форм кислорода, что в дальнейшем приводит к повреждению мембранных липидов, белков, ферментов, пигментов хлоропластов [1, 2]. Содержание малонового диальдегида (МДА), являющегося продуктом перекисного окисления мембран и характеризующего степень развития окислительного стресса в растительных тканях, при концентрации нефти в почве 1 г/кг незначительно уменьшалось, как у необработанных, так и обработанных бактериями растений. При концентрации нефти 10 и 50 г/кг уровень МДА повышался на 30 и 42%, соответственно, у необработанных растений по сравнению с контрольными, выросшими в почве без нефти. У обработанных бактериями растений уровень МДА был ниже на 15–20%, чем у неинокулированных и выросших в почве при тех же концентрациях нефти.

Таким образом, растения, семена которых были предварительно обработаны клетками эндофитов *B. subtilis* 26Д, оказались более устойчивыми к токсическому действию нефти, что, вероятно, связано со способностью этих бактерий продуцировать различные биологически активные вещества, в том числе и фитогормоны – стимуляторы роста и каким то образом компенсировать негативный эффект причиняемый загрязнением почвы нефтью. Например, известно, что РГРВ способны повышать устойчивость растений к негативным факторам благодаря снижению уровня окислительного стресса, усилению активности антиокислительных ферментов [2, 3, 4]. Эндофитные бактерии влияют и на проникновение в растения тяжелых металлов, которые, входит состав нефти [3, 4]. Потенциал стимулирования роста растений в условиях нефтяного загрязнения может быть эффективным подходом к выбору кандидатов РГРВ для применения в биотехнологии био- и фиторемедиации.

Литература

1. Wang M., Garrido-Sanz D., Sansegundo-Lobato P., Redondo-Nieto M., Conlon R., Martin M., Mali R., Liu X., Dowling D.N., Rivilla R., Germaine K.J. Soil Microbiome structure and function in ecopiles used to remediate petroleum-contaminated soil // Front. Environ. Sci. 2021. Vol. 9:624070. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.3389/fenvs.2021.624070
2. Alotaibi F., St-Arnaud M., Hijri M. In-Depth Characterization of Plant Growth Promotion potentials of selected alkanes-degrading plant growth-promoting bacterial isolates // Front. Microbiol., <https://DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.3389/fmicb.2022.863702>
3. Кураמיшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* к кадмий-стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 636–664. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.7868/S0015330316050080
4. Кураמיшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Токсичность кадмия и никеля для растений *sinapis alba*, инокулированных эндофитными *Bacillus subtilis* // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 2. С. 133–142. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.7868/S0015330318020057
5. Максимов И.В., Сингх Б.П., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Хайруллин Р.М. Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34.

Исследование возможности получения этилового спирта из молочной сыворотки

Леушина А.Д.¹, Устюжанинова Л.В.²

^{1,2}Вятский государственный университет, Киров,
stud160846@vyatsu.ru¹, lv_ustuzhaninova@vyatsu.ru² ujilucy9i@gmail.com²

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38395

В настоящее время этиловый спирт является ценным ресурсом в пищевой и химической промышленности. Для его производства используются ценные пищевые ресурсы: картофель, зерновые культуры, сахарная свекла, широко используемые в других областях промышленности [1].

В то же время в России ежегодно образуется около 5 млн т, молочной сыворотки, являющейся отходом молочной промышленности. Около 55%, а это 2,75 млн т, сыворотки не подвергается дальнейшей переработке, а после предварительной очистки сливается на поля и в сточные воды [2]. Этот процесс не только требует определенных экономических затрат, но также увеличивает экологическую нагрузку.

Возможность получения этилового спирта из молочной сыворотки частично решила бы проблему поиска альтернативного сырья при производстве этанола, снизила производственную нагрузку на ценное пищевое сырье, а также уменьшила вред, наносимый окружающей среде при утилизации молочной сыворотки.

Основной целью данного исследования является изучение процесса гидролиза молочной сыворотки с возможностью дальнейшего сбраживания полученного гидролизата сахаромикетами.

Объектом исследования является образец нативной молочной сыворотки, полученный с молокозавода.

В ходе эксперимента использовались метод Низовкина и Емельяновой для определения содержания редуцирующих веществ эбулиостатическим методом, а также метод определения содержания спирта в культуральной жидкости [3].

При проведении гидролиза использовались серная и лимонная кислоты в концентрации 2% масс. Гидролиз проводился двумя методами: в автоклаве при температуре 121 °С в течение 30 минут, а также на кипящей водяной бане (температура нагрева пробы 95–100 °С) в течение 120 минут.

Результаты проделанной работы представлены в табл. 1.

Таблица 1

Исследование процесса сбраживания гидролизата молочной сыворотки без добавления минерального питания

Измеряемые параметры	Гидролиз серной кислотой в автоклаве	Гидролиз серной кислотой на водяной бане	Гидролиз лимонной кислотой в автоклаве	Гидролиз лимонной кислотой на водяной бане
Степень биоконверсии РВ, %	76,48	43,90	11,23	24,97
Концентрация этанола, г/л	11,76	7,34	Не определялось	Не определялось

Как видно из данных таблицы, наибольшая степень биоконверсии наблюдается при проведении гидролиза с помощью серной кислоты. Исходя из этого, было решено повторить эксперимент, добавив в полученный гидролизат элементы минерального питания и дрожжевой экстракт для стимулирования процесса брожения у дрожжей.

В качестве минерального питания были добавлены: аммоний серноокислый в концентрации 5,0 г/л, калий фосфорнокислый в концентрации 1,0 г/л, магний серноокислый в концентрации 0,2 г/л и кальций хлористый в концентрации 0,05 г/л. Дрожжевой экстракт использовался в концентрации 5 г/л.

Результаты данного эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исследование процесса сбраживания гидролизата молочной сыворотки с внесением минерального питания

Измеряемые параметры	С внесением минерального питания и дрожжевого экстракта		С внесением минерального питания, но без дрожжевого экстракта	
	Гидролиз серной кислотой в автоклаве	Гидролиз серной кислотой на водяной бане	Гидролиз серной кислотой в автоклаве	Гидролиз серной кислотой на водяной бане
Степень биоконверсии РВ, %	96,0	53,0	94,0	49,0
Концентрация этанола, г/л	14,76	8,52	14,52	6,0

Как видно из приведенных результатов, внесение дополнительного минерального питания благоприятно сказалось на степени биоконверсии и дальнейшем выходе спирта в анализируемых пробах. Также наибольший выход этилового спирта наблюдается в пробах, подвергнутых гидролизу в автоклаве при температуре 121 °С в течение 30 минут. В дальнейших исследованиях необходимо оптимизировать процесс гидролиза путем подбора наиболее оптимального времени работы автоклава, а также концентрации серной кислоты.

В ходе исследования был проведен ряд экспериментов, направленных на подбор оптимальных условий проведения гидролиза молочной сыворотки с последующим сбраживанием полученного гидролизата. Было выявлено, что наибольший выход этилового спирта наблюдается в пробах, подверженных

гидролизу 2%-ной серной кислотой при температуре 121 °С в течение 30 минут. Добавление в пробу дополнительного минерального питания оказывает положительное влияние на выход этилового спирта. Для оптимизации процессов гидролиза и спиртового брожения требуется проведение дальнейших исследований, направленных на подбор наиболее оптимальных условий.

Литература

1. Яровенко В.Л., Устинников Б.А., Богданов Ю.П., Громов С.И. Справочник по производству спирта. Сырье технология и технохимконтроль // Легкая промышленность. 1981. С. 5–8.
2. Евдокимов И.А. Современное состояние и перспективы переработки молочной сыворотки // Молочная промышленность. 2006. № 2. С. 34–36.
3. Емельянова И.З. Химико-технологический контроль гидролизных производств. М.: Лесная промышленность, 1969. С. 367.

Приживаемость бактерий поликомпонентного бациллярного препарата на семенах различных сельскохозяйственных культур

Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.

Алтайский государственный университет, Барнаул,
gelishka96@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38396

Ризосферные бактерии, оказывающие положительное влияние на растения и повышающие их продуктивность было принято называть PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria). К ним относятся представители родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и др., на основе которых создаются бактериальные препараты для растениеводства (Алексеева, Потатуркина-Нестерова, 2014).

При отборе производственных штаммов для разработки биопрепаратов в первую очередь ориентируются на их биологическую активность – антагонизм по отношению к фитопатогенам, способность продуцировать фитогормоны и пр. (Леонтьевская, 2014) Однако другим немаловажным фактором, влияющим на эффективность микробного средства, является приживаемость действующих бактерий на обрабатываемых растениях.

Цель работы – оценить приживаемость бактерий поликомпонентного бациллярного препарата на семенах различных сельскохозяйственных культур.

В качестве объекта исследования использовался бациллярный биопрепарат, содержащий 3 штамма ризосферных бактерий вида *B. pumilus* из коллекции ИЦ «Промбиотех» (АлтГУ) и предназначенный для предпосевной обработки семян. Препарат представлял из себя лиофильно высушенный концентрат бацилл, рабочий раствор которого был приготовлен из расчета 0,1 г на 10 мл воды. Расход рабочего раствора – 0,1 мл на 10 г семян. В работе использовались семена гречихи, овса, рапса и подсолнечника. В качестве контроля выступали семена, которые не подвергались обработке. В опыте производили протравливание семян рабочим раствором. Сразу после этого устанавливали обсемененность посевного материала путем посева на численность на питательную среду. Обработанные семена дополнительно рассеивали через сутки после обработки. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Параллельно закладывали эксперимент, в котором контрольные и опытные семена раскладывали непосредственно на поверхность агаризованной среды для визуальной оценки приживаемости бацилл биопрепарата. В данном случае инкубирование производили в течение 72 ч.

В соответствии с данными в таблице, численность микроорганизмов на обработанных семенах у всех культур увеличивается в сравнении с контролем. Самыми обсемененными оказались необработанные семена овса.

Влияние биопрепарата на обсемененность семян

Культуры	Численность микроорганизмов на семенах, КОЕ/г		
	Необработанные (контроль)	Обработанные, посев сразу	Обработанные, посев через 24 ч
Овес	$6,70(\pm 0,28) \cdot 10^5$	$1,75(\pm 0,35) \cdot 10^7$	$3,65(\pm 1,06) \cdot 10^6$
Рапс	$4,10(\pm 1,27) \cdot 10^4$	$4,50(\pm 0,71) \cdot 10^7$	$9,10(\pm 1,27) \cdot 10^6$
Подсолнечник	$2,01(\pm 0,13) \cdot 10^4$	$1,08(\pm 0,18) \cdot 10^7$	$2,25(\pm 0,35) \cdot 10^6$
Гречиха	$4,34(\pm 0,62) \cdot 10^4$	$5,10(\pm 1,27) \cdot 10^7$	$4,10(\pm 1,27) \cdot 10^6$

При посеве обработанных семян сразу после протравки биопрепаратом отмечается увеличение численности микроорганизмов по отношению к контрольным образцам на 2–3 порядка. Если опытные семена с внесенным средством для растений хранятся сутки, то титр бактерий снижается на один порядок, но все равно остается выше, чем в контроле. Следовательно, посев семян необходимо производить в первые часы после обработки, чтобы концентрация бацилл биопрепарата оставалась максимальной.

При непосредственном раскладывании семян на чашки было зафиксировано, что морфология колоний микроорганизмов в контроле различна, и КОЕ выросли не возле каждой семечки (у рапса и гречихи). В опыте же вокруг каждого семени отмечался рост бактерий с характерной морфологией действующих штаммов препарата (кремовые с неровным краем и складчатостью). В случае с семенами подсолнечника в контрольных чашках был отмечен рост плесени, а в опыте мицелий грибов фактически не развивался (рисунок).

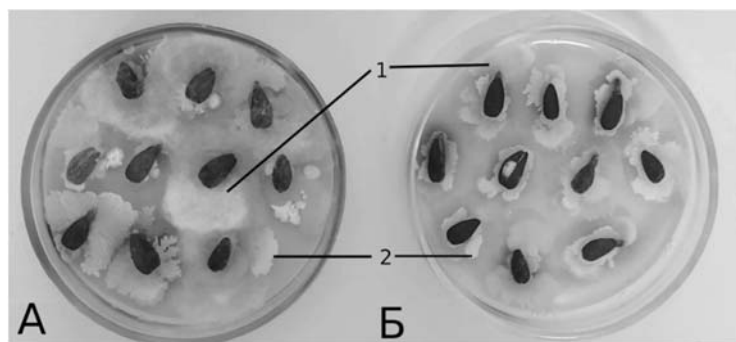


Рис. Семена подсолнечника на агаризованной среде после 3 суток культивирования: А – контрольные, Б – опытные (КОЕ плесени, КОЕ бактерий)

Таким образом можно заключить, что бактерии биопрепарата обладают хорошей приживаемостью на семенах и даже способны угнетать рост неблагоприятной флоры, что обуславливает высокий биотехнологический потенциал новых штаммов. Также это позволяет сделать вывод о том, что расход препарата на массу семян рассчитан верно. Об этом свидетельствует то, что каждая семечка оказалась обработанной, так как вокруг каждой из них проросли бактерии из средства для растений.

Работа реализована при поддержке программы академической мобильности Алтайского государственного университета.

Литература

1. Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Механизмы положительного влияния ризобактерий на жизнедеятельность растений // Современные проблемы науки и образования, 2014. – № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12671> (дата обращения: 19.10.2022).
2. Леонтьевская Е.А. Структура эпифитно-сапротрофных бактериальных комплексов зерновых и овощных культур ... кандидата биологических наук: 03.02.03. – Москва, 2014. – 89 с.

Антибактериальные свойства *Limosilactobacillus fermentum* 3872 против антибиотикорезистентных бактериальных инфекций

Мачулин А.В.¹, Абрамов В.М.^{2,3}, Косарев И.В.^{2,3}, Карлышев А.В.⁴

¹ ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина, and.machul@gmail.com

² ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва

⁴ Кингстонский университет, Лондон, Великобритания

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38397

Многолетнее применение антибиотиков в промышленном животноводстве в качестве стимуляторов роста и ингибиторов кишечных патогенов привели к появлению устойчивых к антибиотикам штаммов и их распространению среди животных и населения мира, потребляющих сельскохозяйственные продукты [1]. Антибиотики, введенные в корма для сельскохозяйственных животных, увеличили распространенность антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов (*Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter*). Потребление продуктов, полученных с использованием кормов, содержащих антибиотики, вызвало увеличение штаммов протеобактерий в микробиоте кишечника человека. Такие штаммы индуцируют развитие дисбактериоза кишечника, а также приводят к снижению его барьерной функции, развитию хронического системного воспаления, поражению сердечно-сосудистой системы, и развитию метаболического синдрома. У женщин репродуктивного возраста кишечный дисбактериоз стимулирует развитие дисбактериоза репродуктивной системы и рост урогенитальных инфекций.

Штамм *Limosilactobacillus fermentum* 3872 (LF3872) первоначально был выделен из молока здоровой женщины в период лактации и грудного вскармливания ребенка. С помощью полногеномного анализа LF3872 [2, 3] выявлен ген, кодирующий гипотетический белок, идентифицируемый базой данных BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/>) как ген ответственный за биосинтез бактериоцина III класса. Бактериоцины III класса представляют собой антимикробные термочувствительные белки с молекулярной массой более 30 кДа, способные расщеплять муреин клеточной стенки, что приводит к лизису бактериальной клетки [4].

В экспериментах по совместному культивированию, грамположительные патогены *Staphylococcus aureus* были высокочувствительны к бактериолитическому действию LF3872. Так, при совместном культивировании с LF3872, уровень *S. aureus* в течение 24 ч снижался на шесть порядков. Культивирование штаммов *E. coli*, в том числе энтеропатогенных и энтеротоксигенных штаммов, а также *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* совместно с LF3872 за 24 ч снижали уровень живых тест-культур на три порядка, а при совместном культивировании в течение 48 ч – на четыре порядка. Культивирование штаммов *C. jejuni* вместе с LF3872 в течение 24 ч снижало уровень тест-культур на два порядка, а за 48 ч уровень клеток снижался на три порядка. Отметим, что термически обработанный LF3872 (56°, 30 минут) не влиял на уровень живых тест-культур *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *C. jejuni* [5].

Дальнейшие эксперименты позволят установить роль найденного бактериоцина в механизмах антибактериальной активности LF3872 против антибиотикорезистентных бактериальных инфекций. Кроме того, результаты исследований свидетельствуют о возможности создания синбиотика для человека на основе штамма LF3872 и синбиотической кормовой добавки для сельскохозяйственных животных. Такие инновационные препараты и биологически активные добавки необходимы для реализации стратегии по снижению распространения антибиотикорезистентных штаммов социально значимых инфекций животных и человека.

Работа поддержана грантом Правительства Российской Федерации (Соглашение от 01.07.2022г. № 075-15-2022-1124).

Литература

1. Nørgaard S.M. et al. Choice of therapeutic interventions and outcomes for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative pathogens: a systematic review. // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2019. Vol. 8, № 1. P. 170.
2. Lehri B., Seddon A.M., Karlyshev A.V. Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872. // Stand. Genomic Sci. 2017. Vol. 12, № 1. P. 19.
3. Lehri B., Seddon A.M., Karlyshev A.V. *Lactobacillus fermentum* 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity // FEMS Microbiol. Lett. 2015. Vol. 362, № 11.
4. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, № Database issue. P. D227-33.
5. Abramov V.M. et al. *Limosilactobacillus fermentum* strain 3872: antibacterial and immunoregulatory properties and synergy with prebiotics against socially significant antibiotic-resistant infections of animals and humans // Antibiotics. 2022. Vol. 11, № 10. P. 1437.

Экстремотолерантный организм *Aspergillus niger* AM1

Миндубаев А.З.¹, Бабынин Э.В.², Минзанова С.Т.³

¹ Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН

² Татарский НИИАХП ФИЦ КазНЦ РАН

³ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН,
mindubaev-az@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38398

Биодеградация является важным методом переработки промышленных отходов [1]. Населяющие Землю микроорганизмы приспособляются к самым неблагоприятным условиям существования и являются своего рода «иммунной системой» биосферы, способной перерабатывать в биогенные элементы рукотворные вещества практически любого химического строения и класса опасности.

Наш коллектив занимается исследованием биодеградации уже более тринадцати лет. Из них восемь мы изучаем интересный штамм гриба черного аспергилла *Aspergillus niger* AM1, выделенный в октябре 2014 года из уникального источника – емкости с кусковым белым фосфором, заполненной водой. Споры гриба выжили в этих уникальных условиях! И, более того, аспергилл оказался способен обезвреживать белый фосфор.



Рис. 1. Рост грибов *A. niger* в культуральной среде, содержащей белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. Среда с 0.05% белого фосфора. Эта концентрация соответствует 250 ПДК! Чашка сфотографирована через шесть суток после посева

Известно, что практически во все среды, используемые для культивирования микроорганизмов, вносят растворимые фосфаты натрия или калия. Фосфор является биогенным элементом и необходим для роста абсолютно всех форм жизни. Выделенный нами гриб растет в культуральной среде, содержащей белый фосфор в качестве единственного источника фосфора (рис. 1). То есть, окисляет белый фосфор до фосфата и включает его в состав растущей биомассы. Биодеградацию белого фосфора – крайне токсичного и опасного в обращении вещества, относящегося к первому классу опасности и применяемого в военных целях, наш коллектив наблюдал впервые в мире [2]. Аналогичных работ в статьях и патентах на русском и на английском языках мы не нашли.

Разумеется, мы стали расширять поиск веществ, разлагаемых *A. niger* AM1. Начали с веществ, содержащих фосфор. Выяснили, что он растет в средах, содержащих фосфонаты (в том числе гербицид глифосат), дитиофосфаты, фосфорамиды, фосфорномолибденовую и фосфорно-

вольфрамовую кислоты. Кроме того, штамм оказался солибилизатором фосфата – он хорошо растет в средах с нерастворимым в воде ортофосфатом кальция.

Филогенетическое дерево штамма, построенное по базе нуклеотидных последовательностей NCBI показало, что ближайшими родственниками AM1 являются два штамма *Aspergillus niger* из Китая (обнаружены недалеко от Нанкина), которые также солибилизируют нерастворимые фосфатные минералы. В целом, кластер штаммов, к которому относится наш штамм, распространен в Юго-Восточной Азии и Индии. Вероятно, белый фосфор, с которым мы работаем, был произведен в Китае, и вместе с ним к нам был завезен китайский штамм гриба.

Исследования показали, что белый фосфор оказывает заметное воздействие на белковый профиль и морфологию нашего штамма. Включаются защитные механизмы – утолщение и изменение структуры клеточной стенки, рост числа и размера митохондрий, появление новых белков в протеоме. Интересно, что в декабре 2016 года мы получили дочерний штамм гриба *A. niger* AM2, еще более адаптированный к росту в среде с белым фосфором. Утолщенная клеточная стенка и увеличенные митохондрии у него наблюдаются и в контроле, в отсутствие этого токсичного вещества [3].

В настоящее время мы исследуем биодegradацию при помощи AM1 и AM2 веществ, не содержащих фосфор – нефтей и нефтепродуктов, древесины и продуктов ее переработки. Также, планируем изучать переработку полимерных материалов данными штаммами.

Литература

1. Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation / L.P. Wackett // The Prokaryotes. 2013. Vol. 2. P. 383–393.
2. Mindubaev A.Z. Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard / A.Z. Mindubaev, E.V. Babynin, E.K. Bedeeva, S.T. Minzanova, L.G. Mironova, Y.A. Akosah // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2021. Vol. 66. No.8. – P. 1239–1244.
3. Mindubaev A.Z. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger* / A.Z. Mindubaev, S.V. Kuznetsova, V.G. Evtyugin, A.G. Daminova, T.V. Grigoryeva, Y.D. Romanova, V.A. Romanova, V.M. Babaev, D.N. Buzyurova, E.V. Babynin, E.K. Badeeva, S.T. Minzanova, L.G. Mironova // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol. 56. No.2. – P. 194–201.

Влияние концентрации азота на биосинтез лимонной кислоты у дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН),
morgunovs@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38399

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* хорошо известны своей способностью синтезировать лимонную кислоту (ЛК) в значительных количествах при использовании различных источников углерода и энергии.

Целью данной работы было определение кинетических и балансных соотношений в процессе биосинтеза ЛК дрожжами *Y. lipolytica* в среде с глюкозой при различных лимитирующих концентрациях сульфата аммония.

Объектом исследования служил штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, который синтезирует значительное количество ЛК в среде с глюкозой [1].

Проведено выращивание продуцента *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 в 10-ти л ферментере АНКУМ-2М с рабочим объемом 6 л. Оптимальные условия культивирования, обеспечивающие максимальную продуктивность биосинтеза ЛК из глюкозы, включали: ограничение роста дрожжей источником азота при избыточном содержании источника углерода; стабильное поддержание pH на уровне 6,0; аэрация среды

на уровне 50% (от насыщения). Глюкозу вносили дробно по 20 г/л по мере потребления из среды культивирования. Время культивирования – 144 ч.

Параметры процесса биосинтеза ЛК, такие как выход клеток по массе ($Y_{x/s}$) (г/г), выход ЛК по массе ($Y_{p/s}$) (г/г), объемная продуктивность (Q_p) (г/л·ч); удельная скорость синтеза продукта (q_p/x) (г/г·ч), рассчитывали по уравнениям: $Y_{x/s} = x/s$, $Y_{p/s} = p/s$, $Q_p = p/(v \cdot t)$, $q_p = p/(x \cdot t)$, где p – общее количество ЛК в культуральной жидкости в конце культивирования (г), s – общее количество потребленного субстрата (г), x – общее количество биомассы в культуральной жидкости в конце культивирования (г), v – начальный объем культуральной жидкости (л), t – время инкубации (ч).

Влияние концентрации сульфата аммония на рост *Y. lipolytica* ВКМУ-2373 и синтез ЛК был изучен в диапазоне от 2 до 10 г/л. Динамика роста продуцента имела одинаковый характер и не зависела от содержания азота в среде. Экспоненциальный рост продолжался с 3 до 12 ч; с 12 до 24 (при 2 и 3 г/л $(NH_4)_2SO_4$) или до 36 ч (выше 4 г/л $(NH_4)_2SO_4$) культура находилась в фазе замедленного роста, и в это время азот полностью был потреблен, а вся усвоенная глюкоза направлялась на рост биомассы, накопления ЛК не происходило. Синтез ЛК интенсивно происходил в стационарной фазе после 24–36 ч культивирования во всех вариантах опыта; максимальное накопление ЛК наблюдалось на 144 ч.

В табл. 1 представлены данные о параметрах роста и кислотообразования у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. При повышении концентрации $(NH_4)_2SO_4$ с 2 до 10 г/л наблюдалось увеличение накопления биомассы в 4,3 раза и выхода клеток по массе ($Y_{x/s}$) – в 2,4 раза. Значение максимальной удельной скорости роста (μ_{max}) варьировало незначительно (0,23–0,27 ч⁻¹) при разных концентрациях азота.

Таблица

Влияние концентрации азота на параметры роста и синтеза ЛК у *Y. lipolytica*

Параметры	$(NH_4)_2SO_4$ (г/л)				
	2	3	4	6	10
Биомасса (г/л)	6,38	10,15	12,05	22,11	27,25
Выход клеток по массе ($Y_{x/s}$) (г/г)	0,07	0,10	0,10	0,17	0,17
Максимальная удельная скорость роста μ_{max} (ч ⁻¹)	0,23	0,24	0,24	0,24	0,27
Лимонная кислота (г/л)	53,05	80,30	99,90	95,48	81,98
Изолимонная кислота (% от суммы кислот)	3,18	4,80	5,97	5,74	8,09
Выход ЛК по массе ($Y_{p/s}$) (г/г)	0,58	0,78	0,77	0,72	0,52
Удельная скорость синтеза ЛК (q_p) (г/г·ч)	0,06	0,05	0,06	0,03	0,02
Объемная продуктивность (Q_p) (г/л·ч)	0,48	0,81	0,86	1,11	0,57

Как видно из табл. 1, наименьшее количество ЛК (53,05 г/л) синтезировалось при 2 г/л $(NH_4)_2SO_4$. При увеличении концентрации сульфата аммония с 2 до 4 г/л происходило увеличение синтеза ЛК в 1,9 раза. Дальнейшее увеличение концентрации $(NH_4)_2SO_4$ с 4 до 10 г/л сопровождалось снижением синтеза ЛК в 1,2 раза. Максимальное накопление ЛК (99,9 г/л) у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 наблюдалось при концентрации сульфата аммония, равной 4 г/л.

Как видно из таблицы 1, при концентрациях $(NH_4)_2SO_4$ (г/л), равных 2 и 4 г/л, доля изолимонной кислоты (ИЛК) составляла 3,18–4,8% (от суммы кислот). Однако при повышении концентрации сульфата аммония до 10 г/л доля ИЛК в общем пуле кислот увеличивалась до 8,09%.

Как видно из таблицы 1, высокий выход ЛК от потребленной глюкозы ($Y_{p/s}$) (0,72–0,78 г/г) наблюдался при концентрации сульфата аммония в диапазоне от 3 до 6 г/л и снижался до 0,57 г/г и 0,52 г/г при низком или высоком содержании сульфата аммония, соответственно. Удельная скорость синтеза продукта (q_p) была снижена в 3 раза при концентрации сульфата аммония, равной 10 г/л. Объемная продуктивность (Q_p) поддерживалась на достаточно высоком уровне (0,81–1,11 г/л·ч) при 3–6 г/л сульфата аммония и снижалась до 0,48 и 0,57 г/л·ч при снижении азота до 2 г/л или повышении до 10 г/л, соответственно.

Полученные результаты находятся на уровне лучших показателей биосинтеза ЛК в среде с глюкозой с помощью дрожжей *Y. lipolytica*. Для сравнения природный штамм *Y. lipolytica* К57 в среде с глюкозой при оптимизированных условиях синтезировал 72,3 г/л ЛК с выходом продукта ($Y_{p/s}$) и удельной ско-

ростью синтеза ЛК (qp), равными 0,77 г/г и 0,04 г/г·ч, соответственно [2]. О высокой кислотообразующей активности сообщалось для рекомбинантных штаммов с суперэкспрессией гена пируват-карбок-силазы: *Y. lipolytica* PG86 (101 г/л ЛК, $Y_{P/S} = 0,75$ г/г и $Q_p = 0,42$ г/л·ч) [3] и *Y. lipolytica* PR32 (111,1 г/л ЛК, $Y_{P/S} = 0,92$ г/г и $Q_p = 0,46$ г/л·ч) [4].

Литература

1. Kamzolova et al. *Bioresour. Technol.* 2017, 243, 433–440.
2. Carsanba et al. *Yeast*, 2019, 36(5), 319–327.
3. Tan et al. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2016, 39, 1289–1296.
4. Fu et al. *Mar. Biotechnol.* 2016, 18, 1–14.

Солюбилизация *n*-гексадекана в воде в присутствии бактериальных поверхностно-активных веществ

Парфенова А.С.

Тульский государственный университет, Тула,
asya17.parfenova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38400

Наряду со способностью снижать поверхностное и межфазное натяжение, эмульгированию, пенообразованию и т.д., солюбилизация является распространенным физико-химическим свойством поверхностно-активных веществ (ПАВ), поддерживающим множество бытовых и промышленных процессов, начиная с повседневной гигиены, мытья посуды и стирки, включая биоремедиацию земельных участков, загрязненных углеводородами, и системы транспортировки лекарственных препаратов. Для любого конкретного применения солюбилизации крайне важно уменьшить воздействие ПАВ на окружающую среду и самого человека и в то же время обеспечить высокую эффективность применения данных веществ. Широко применяемые синтетические ПАВ при накоплении в окружающей среде могут оказывать неблагоприятное действие на живые организмы, так как являются ксенобиотиками. Природные ПАВ (биоПАВ или биосурфактанты), полученные из животных или растительных материалов, являются альтернативой синтетическим ПАВ, так как не являются ксенобиотиками, но при этом обладают теми же самыми свойствами (Рудакова и др., 2021).

Целью данной работы является сравнительный анализ эффективности солюбилизирующей способности бактериальных гликолипидных и синтетических ПАВ в отношении нерастворимого в воде *n*-гексадекана.

Объектом исследования в нашей работе являлись сукцинилтрегалолипиды, продуцируемые бактериями *Rhodococcus erythropolis* S67, входящие в состав биопрепарата «МикроБак» (патент РФ № 2378060; Филонов и др., 2007), который применяется для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Ранее было показано, что трегалолипидные биосурфактанты способны солюбилизировать *n*-гексадекан в водных растворах, концентрация которого была определена газохроматографическим методом (Парфенова А.С., 2022). Для описания процесса солюбилизации использовали молярный коэффициент солюбилизации, (*molar solubilization ratio* – MSR); и энергию солюбилизации (ΔG_s). Эти характеристики рассчитывали на основе солюбилизированного *n*-гексадекана выделенными биосурфактантами, результаты представлены в сравнительной табл. 1. Количество биосурфактантов было взято выше критической концентрации мицеллообразования, $K_{CM} = 3,83 \cdot 10^{-5}$ ммоль/л.

Изотерма солюбилизации имеет линейный характер (рис. 1) при концентрации трегалолипидов выше K_{CM} , что свидетельствует о постоянной форме мицелл. Представленная изотерма солюбилизации позволяет также определить значение MSR, которое равно тангенсу угла наклона прямой проведенной к

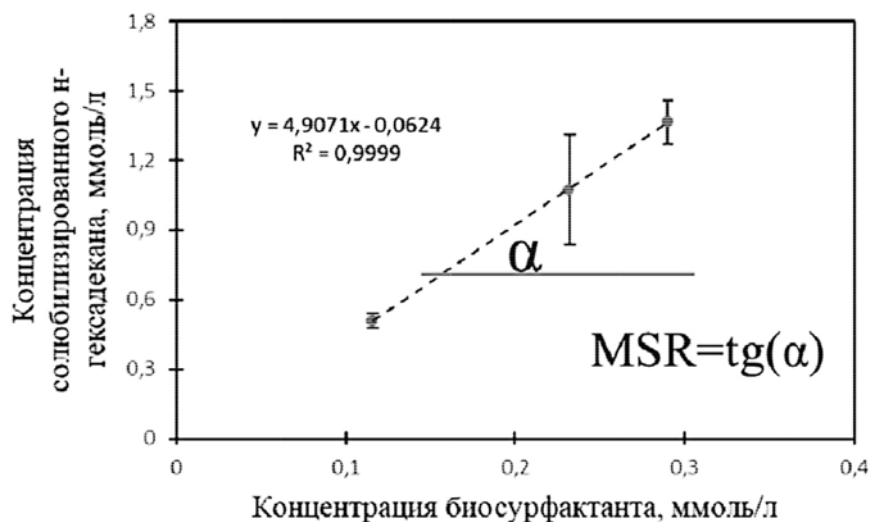


Рис. 1. Изотерма солюбилизации гексадекана мицеллами биосурфактантов

линии-тренда. MSR – это количество солюбилизата (n -гексадекана), которое может быть солюбилизовано одним молем мицеллярного раствора ПАВ и характеризует в целом способность ПАВ солюбилизовать n -гексадекан.

Для изученной системы величина свободной энергии солюбилизации имеет отрицательное значение, что указывает на протекающий самопроизвольный процесс солюбилизации.

В табл. 1 представлены значения MSR различных систем определенные газохроматографическим методом. Эти значения отличаются друг от друга, вследствие того, что есть различие в природе солюбилизата и солюбилизатора, в условиях поставленного опыта (температура, наличие перемешивания, время выдерживания, значение pH). Все данные факторы влияют на величину ККМ и, следовательно, на солюбилизирующую способность ПАВ.

Таблица 1

Сравнительная таблица полученных и литературных данных физико-химических характеристик солюбилизации различных по природе веществ

ПАВ	Солюбилизат	MSR , моль/моль	ΔG_s° , кДж/моль	Ссылка
Трегалополипиды	гексадекан	4,91	-35,5	Данная работа
Монорамнолипиды		0,89	-	
Дирамнолипиды		3,8	-	
Додecilсульфат натрия (ДСН)	гексадекан	0,018±0,002	-54,5	Заруева, 2020
	перхлорэтилен	0,16	-	Harendra S., 2011
Твин 80	гексадекан	15,1±0,7	-64,4	Заруева, 2020
	гексахлорэтан	0,15	-	Rodrigues R., 2017
Тритон X-100	гексадекан	40±8	-64,6	Заруева, 2020
	гексахлорбутадиеи	1,22	-	Rodrigues R., 2017

Среди гликолипидных биосурфактантов (табл. 1) изучаемые трегалополипиды эффективней солюбилизируют n -гексадекан в водных растворах. Однако уступают в солюбилизации гексадекана синтетическим ПАВ – Твин 80 и Тритон X-100, которые лучше солюбилизируют n -гексадекан. Возможно, это связано с наличием заряда в молекулах ПАВ – трегалополипиды, продуцируемые бактериями *Rhodococcus erythropolis S67*, относятся с слабоионогенным ПАВ за счет наличия остатка янтарной кислоты в составе молекулы. Напротив, Твин 80 и Тритон X-100 относятся к неионогенным ПАВ, т.е. их молекулы не имеют заряженной группы. Молекула же ДСН (анионогенный ПАВ) несет один отрицательный заряд, величина которого по сравнению с величиной заряда молекулы трегалополипида вероятно значительно выше, что может влиять на разницу в количестве солюбилизованного n -гексадекана.

Бактерии-нефтедеструкторы *Rhodococcus erythropolis* S67 обладают значительным биотехнологическим потенциалом для получения сукциноилтрегалополипидов с целью их дальнейшего применения в сферах жизнедеятельности человека и требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. *Harendra S., Vipulanandan C.* Effects of surfactants on solubilization of perchloroethylene (PCE) and trichloroethylene (TCE) // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2011. – Т. 50. – № 9. – С. 5831–5837.
2. *Rodrigues R. et al.* Influence of temperature and surfactants on the solubilization of hexachlorobutadiene and hexachloroethane // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2017. – Т. 62. – № 10. – С. 3252–3260.
3. *Zhong H. et al.* Degradation of pseudo-solubilized and mass hexadecane by a *Pseudomonas aeruginosa* with treatment of rhamnolipid biosurfactant // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2014. – Т. 94. – С. 152–159.
4. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения / А.Е. Филонов [и др.]. Патент на изобретение РФ № 2378060, 05.07.2007
5. *Заруева Е.С., Нечаева И.А., Понаморева О.Н.* Солюбилизация n-гексадекана в минеральной водной среде в присутствии поверхностно-активных веществ // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2020.
6. *Рудакова М.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю.* Биосурфактанты: современные тренды применения // *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки*. – 2021. – Т. 163. – № 2. – С. 177–208.
7. *Парфенова А.С.* Сравнительный анализ методов определения солюбилизирующей способности поверхностно-активных веществ различного происхождения: Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2022» (материалы конференции). – 2022 – С. 196–198.

Способы детекции антагонистической активности микроорганизмов

Полюдова Т.В., Коробов В.П., Лемкина Л.М., Есаев А.Л.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал Пермского Федерального исследовательского центра УрО РАН,
polyudova@iegm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38401

Распространение антибиотикорезистентных микроорганизмов в популяциях человека и животных убедительно демонстрирует колоссальный успех бактерий и микромицетов в их адаптации к антибиотикам. Не смотря на активный поиск новых антимикробных средств, интенсивность их разработки и внедрения существенно уступают скорости приобретения резистентности микробами. Вместе с тем, источники эффективных противомикробных соединений давно известны. Как правило, антибиотики – это природные соединения, выделяемые самими бактериями и грибами с целью подавления ближайшего конкурентного окружения. С завидной регулярностью происходит выделение бактерий – продуцентов антимикробных соединений, поскольку они являются более удобными объектами для поиска и получения биологически активных веществ.

Целью работы явился обзор методов выявления микробов-антагонистов и способов детекции антибактериальной активности (АБА).

Микроорганизмы, синтезирующие специфические факторы антагонизма, постоянно присутствуют в окружающей нас среде. Так, при оценке микробной обсеменённости воздуха или подсчете ОМЧ почв можно обнаружить колонии бактерий или плесени, ингибирующих рост ближайшего микробного окружения (рис. 1А). Простым и наглядным методом скрининга микробов-антагонистов является метод перпендикулярных штрихов [1], который позволяет оценить спектр микробов, чувствительных к синтезируемому продуцентом соединению (рис. 1Б).

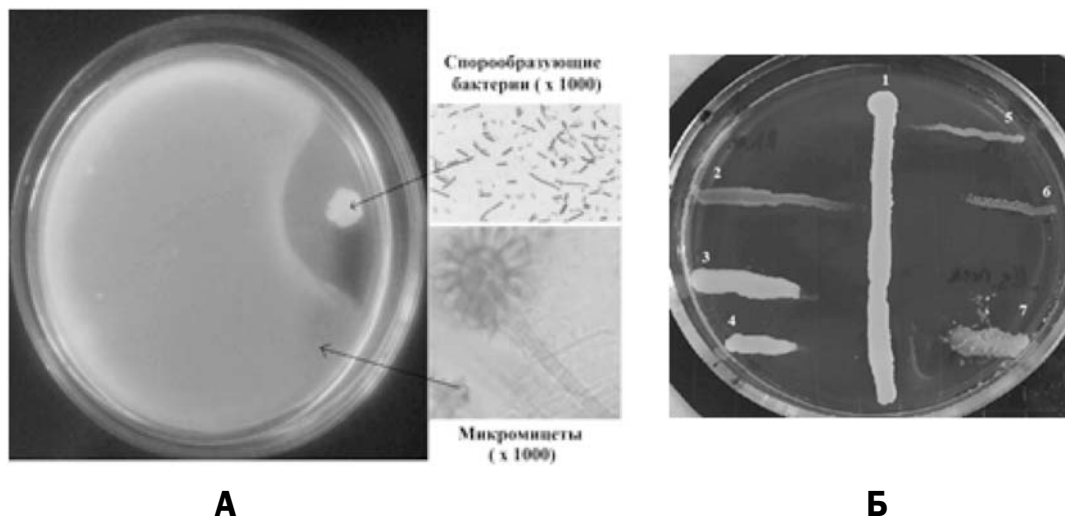


Рис. 1. Способы обнаружения микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью. А – ингибирование роста плесени вокруг колонии бактерий; Б – антибактериальная активность *S. warneri* KL-1 (1) [2] в отношении бактерий *E. faecalis* NCIMB 13280 (2), *S. epidermidis* ATCC 12228 (3), *S. cohnii* ВКМ- (4), *E. coli* ATCC 25922 (5), *M. smegmatis* mc² 155 (6), *M. smegmatis* ГИСК 607, выявленная методом перпендикулярных штрихов

Быстрым и наглядным способом детекции АБА в бесклеточных культуральных жидкостях и растворах является метод, основанный на диффузии вещества в плотную питательную среду. В качестве уплотнителя используется агароза, а питательной основы – среда Мюллера Хинтона. Использование агарозы, вместо агара позволяет получить менее плотную гелевую пластинку, в которой создаются благоприятные условия для развития иммобилизованных в неё тест-бактерий и диффузии исследуемого соединения. При этом аликвоты раствора наносят поверх агарозной пластинки, без необходимости формирования в ней лунок. Зоны подавления роста выявляются после периода инкубации при оптимальной для тест-бактерий температуре (рис. 2).

Количественную оценку АБА различных соединений проводят общепринятым методом двукратных разведений в жидкой или плотной питательных средах [3]. Визуализацию роста индикаторных бактерий по окончании инкубации в жидких средах можно проводить с помощью солей тетразолия. Их способность восстанавливаться под действием ферментов дыхательной цепи с образованием окрашенного продукта – формазана позволяет выявить метаболически активные клетки аэробных бактерий [4]. При тестировании АБА методом разведения в агаре важно понимать статическое или цидное действие оказывает данное антибактериальное соединение. Для этого, нами предложен метод культивирования агаровых блоков в жидкой питательной среде, подробно описанный ранее [5].

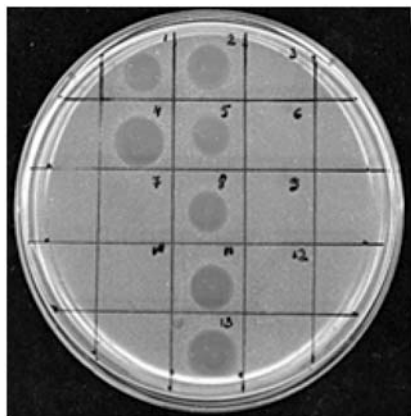


Рис. 2. Пример детекции АБА методом диффузии в агарозу в бесклеточных средах культивирования стафилококков, полученных в поздней стационарной фазе. АБА выявлена в пробах 1, 2, 4, 5, 8, 11 и 13. В качестве тест-бактерий – *S. cohnii* ВКМ-3165

Важным моментом выявления АБА является выбор индикаторного штамма. В лаборатории авторов используются бактерии *S. cohnii* ВКМ-3165, которые являются высоко чувствительными ко многим антимикробным соединениям. При изучении механизма действия лантибиотика варнерина было показано, что на бактериях *S. cohnii* ВКМ-3165 реализуются такие его эффекты как диссипация трансмембранного потенциала, генерирование свободных радикалов и активация пептидогликангидролаз клеточных стенок [2].

Таким образом, обобщение ряда полезных техник для экспериментов *in vitro* может послужить руководством для начала исследований в данной области научных изысканий.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119112290009-1.

Литература

1. Ковалевская В.С., Молодкина Н.Р., Тимофеев Т.И. Антагонистические свойства пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // Электронный сетевой политематический журнал «Научные труды КубГТУ». 2016. № 14. С. 785–791.
2. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. Механизм антибактериального действия лантибиотика варнерина // Микробиология. 2022. Т. 91. № 2. С. 217–225.
3. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». 2015 г.
4. Калинина А.А., Македошин А.С., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф. Кинетическое исследование восстановления иоднитротетразолия хлорида суспензией в физиологическом растворе грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* // Теоретич. и прикл. экология. 2018. № 1. С. 25–32.
5. Eroshenko D., Polyudova T., Pyankova A. NapBC and MazEF toxin/antitoxin systems in the regulation of biofilm formation and antibiotic tolerance in nontuberculous mycobacteria // International Journal of Mycobacteriology. 2020. V. 9. № 2. P. 156–166.

КПД ферментного/микробного топливного элемента; влияние наноматериалов

Решетилов А.Н.¹, Тарасов С.Е.¹, Плеханова Ю.В.¹, Арляпов В.А.²

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
anatol@ibpm.pushchino.ru

² Тульский государственный университет, Тула

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38402

Эффективность генерации электрической энергии БТЭ определяется величиной КПД биотопливного элемента, а именно, отношением количества электронов, содержащихся в окисляемой биомассе, к тому их количеству, которое преобразуется в электрический ток. Оценка КПД для микробного топливного элемента (мБТЭ) представляет более сложную задачу в сравнении с оценкой для ферментного. В первом случае могут использоваться различные по составу субстратные смеси и трудности могут быть связаны с наличием/отсутствием данных о полном метаболизме их окисления; для ферментного же БТЭ используется один полностью окисляемый субстрат, что в общем случае упрощает оценку. В представленных данных приведена попытка качественной оценки КПД, получаемой для моделей БТЭ на основе фермента глюкозооксидазы (ГОД) и микробного топливного элемента (мБТЭ), в котором применены бактерии рода *Glucanobacter*. Для вычисления КПД использовали подход, предложенный в работе Б. Логана [1]. Приведено также вычисление КПД по результатам биоэлектрокаталитических измерений. Рассмотрели влияние на величину КПД наноматериалов (ПЭДОТ:ПСС – поли(3,4-этилендиокситиофен-поли(стиролсульфонат), графен). Указанные наноматериалы могут вызывать рост тока за счет снижения внутреннего сопротивления элемента.

Существуют различные подходы и методы, применяемые для оценки КПД БТЭ. В монографии Б. Логана [1] используется оценка КПД на основе кулоновских соотношений, которая применяется и в представленной работе. Кроме этого, величину КПД можно оценить на основе информации, содержащейся в биоэлектрокаталитических характеристиках – циклических вольт-амперных, нагрузочных, мощностных; он также применен в данной работе и упоминается как энергетический. Также имеется ряд публикаций о вычислении КПД на основе математических моделей. Отметим, что приведенные публикации нельзя рассматривать как базовые, дающие общий рецепт по вычислению КПД. Они показывают, как можно в определенных случаях использовать математическое моделирование биохимических процессов в БТЭ и сочетать их с методами, предложенными Б. Логаном.

Цель исследования состояла в создании макетов ферментного и микробного БТЭ и применении кулоновского принципа оценки их КПД. Представлялась важной также оценка вопроса об изменении КПД при модификации анода БТЭ путем введения в его композицию наноматериалов – ПЭДОТ:ПСС и графена. По полученным ранее результатам указанная композиция приводила к росту тока и снижению внутреннего сопротивления электрода [2].

В исследовании использовали двухкамерную модель мБТЭ, аналогичную описанной в [3]. При оценке КПД на основании кулоновского подхода (кулоновская эффективность, C_E) КПД (тождественно C_E) определяли как отношение зарядов, прошедших по внешней цепи, к общему количеству зарядов, исходно содержащихся в субстрате по следующему выражению:

$$C_E = \frac{M_s \int_0^{t_b} I dt}{F b_{es} v_{An} \Delta c}$$

M_s – молекулярная масса окисляемого субстрата, в качестве которого использовали глюкозу ($M_s = 180$ г/моль). t_0 и t_b – время начала и окончания измерения. F – число Фарадея, $\approx 96\,500$ Кл/моль; V_{An} – объем анодного отделения; Δc – разность концентрации субстрата в начале и в конце измерения; $I_{БТЭ}$ – уровень генерированного тока; b_{es} – количество электронов, необходимых для окисления 1 М субстрата (для глюкозы $b_{es} = 24$ моль-электронов/моль вещества). Полученные результаты приведены в таблице.

Таблица

Значения КПД при различных условиях измерений

Параметр	Ферментный БТЭ		Микробный БТЭ		БТЭ на основе МФ с НМ
	Без НМ	С НМ	Без НМ	С НМ	
Время измерения, ч	0.5	6.3	72	14.8	16.6
Вычисленное значение C_E /КПД	0.001 (0.1%)	0.004 (0.4%)	0.0124 (1.24%)	0.016 (1.6%)	0.0266 (2.66%)

При соблюдении общей схемы измерения параметры БТЭ в эксперименте варьировали. Так, для получения большей информации изменяли время наблюдения и концентрацию глюкозы, площадь рабочего электрода. Анализ ошибок измерения КПД показал, что разбросы в вычислении могут быть связаны с оценкой изменения концентрации субстрата, а именно, его убыли. Применение наноматериалов приводило к росту КПД как в случае изучения ферментного БТЭ, так и для БТЭ на основе микробных клеток. Этот эффект можно связать с понижением общего внутреннего сопротивления БТЭ, которое достигается при использовании наноматериалов и приводит к росту каталитического тока и генерируемой биотопливными элементами мощности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания по теме «Синтез целевых биологически активных ионных соединений и новых биоконструктивных материалов» (FEWG-2021-0011).

Литература

1. Logan B. Microbial fuel cells. J. Wiley & Sons. 2008.
2. Plekhanova Yu.V., Tarasov S.E., Kitova A.E., Kolesov V.V., Kashin V.V., Sundramoorthy A.K., Reshetilov A.N. Modification of thermally expanded graphite and its effect on the properties of the amperometric biosensor // 3 Biotech. 2022. V. 12. № 42. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1007/s13205-021-03107-w
3. Tarasov S., Plekhanova Y., Kashin V., Gotovtsev P., Signore M.-A., Francioso L., Kolesov V., Reshetilov A. Gluconobacter oxydans-based MFC with PEDOT: PSS/Graphene/Nafion Bioanode for Wastewater Treatment // Biosensors. 2022. № 12. P. 699. https:// DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251.org/10.3390/bios12090699.

Механизмы положительного влияния ризобактерий на рост сельскохозяйственных культур

Светлакова Н.А., Серазетдинова Ю.Р., Асякина Л.К.

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово,
svetlakova32@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38403

Ризобактерии – бактерии, связанные с корнями и способные оказывать положительное влияние на рост растений. Они также влияют на общее состояние растений, способствуя лучшему усвоению питательных веществ, повышая устойчивость к различным абиотическим стрессам. Различные штаммы ризобактерий способны повышать урожайность сельскохозяйственных культур, повышать устойчивость к патогенам, способствовать появлению всходов, а также являться биомаркерами состояния экосистемы.

Ризобактерии, способные стимулировать рост растений:

- *Acinetobacter*;
- *Aeromonas*;
- *Bacillus*;
- *Chromobacterium*;
- *Enterobacter*;
- *Flavobacterium*;
- *Streptomyces* и др. [1].

Механизмы положительного влияния ризобактерий на рост растений делятся на две группы:

- 1) прямые;
- 2) косвенные (рис. 1).

Прямое воздействие включает улучшение питания растений путем обеспечения фитонутриентами, такими как фиксированный азот, минералы из почвы, минеральные питательные вещества (P, K, Zn, Fe). Процесс фиксации азота осуществляется с помощью нитрогеназы, преобразующей атмосферный азот в аммонийную форму, которая либо становится доступной для растений, либо выделяется в почву.

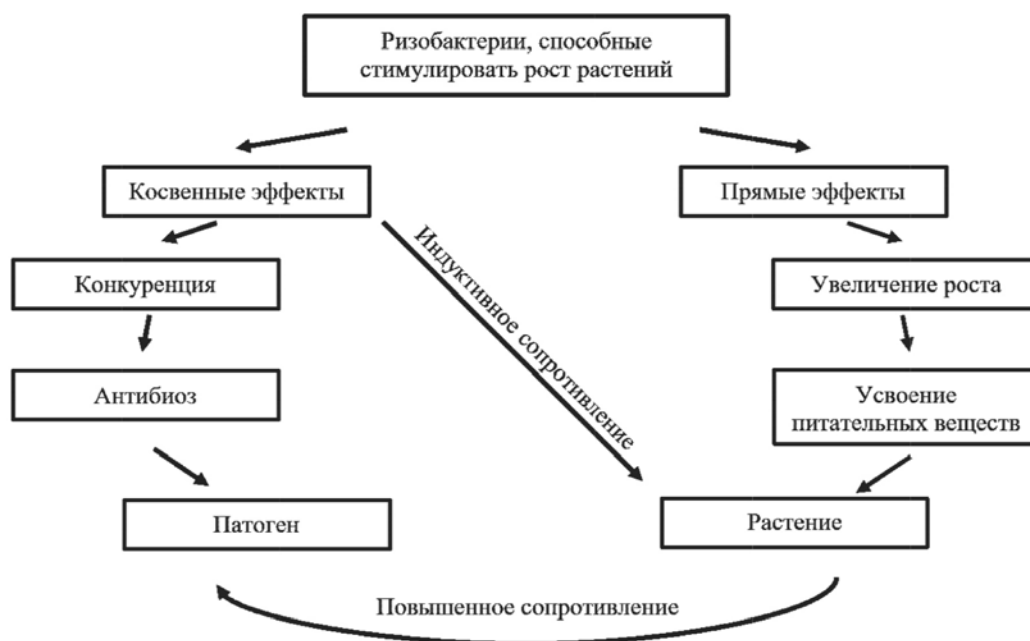


Рис. 1. Механизмы влияния ризобактерий на растения

Также к прямым механизмам относится стимуляция роста. Многие ризобактерии способны вырабатывать фитогормоны, которые регулируют рост растений, влияют на физиологические процессы. Так, они могут способствовать развитию более разветвленной корневой системы, за счет чего растение будет получать больше питательных веществ из почвы.

Фитогормоны, влияющие на рост растений:

- 1) ауксины (влияют на развитие корневой системы);
- 2) цитокинины (способствуют делению клеток);
- 3) гиббереллины (регулируют процессы развития) [2].

Косвенные механизмы подразумевают подавление вредных микроорганизмов путем паразитирования, конкуренции за питательные вещества в ризосфере, продуцирования антагонистических веществ, таких как:

- феназин;
- диацетилфлороглюцинол;
- цианистый водород;
- ацетоин;
- сидерофоры.

Литические ферменты, а именно хитиназа и глюконаза способны разрушать клеточную стенку грибковых патогенов, например, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum*, *Phytophthora* [3].

Так, ризобактерии способны влиять на рост и развитие сельскохозяйственных культур, а также на подавление заболеваний с помощью нескольких механизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания для выполнения научно-исследовательских работ по теме «Разработка подходов к фиторемедиации посттехногенных ландшафтов с использованием стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPB) и «омиксных» технологий», дополнительное соглашение № 075-03-2021-189/4 от 30.09.2021 (внутренний номер 075-ГЗ/Х4140/679/4).

Литература

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects / A. Basu, P. Prasad, S. Kalam et al. // Sustainability. – 2021. – V. 13. – P. 1–20.
2. Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production / K. Swarnalakshmi, V. Yadav, D. Tyagi et al. // Plants. – 2020. – V. 9. – P. 1–25.
3. Ключевой стимулятор роста растений – ризобактерии / Ха Тхи Зунг, А.В. Канарский, З.А. Канарская и др. // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2020. – №3. – С. 58–73.

Бактерии рода *Streptomyces* как наиболее важные актиномицеты и их влияние на развитие растений

Светлакова Н.А., Серазетдинова Ю.Р.

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово,
svetlakova32@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38404

Актиномицеты составляют значительный процент микробного сообщества почвы. Производимые ими метаболиты разнообразны по своей биологической активности и функциям, таким как противогрибковая, инсектицидная, антибактериальная и противоглистная активность. Актиномицеты, как и другие микроорганизмы, способствующие росту растений, также продуцируют фитогормоны и солибилизи-

руют фосфат. За счет способности колонизировать корни растений, бороться с патогенами, синтезировать внеклеточные белки, вырабатывать антибиотики и разлагать фитотоксины они оказывают значительное влияние на рост растений.

К актиномицетам относятся:

- *Streptomyces*;
- *Actinomyces*;
- *Nocardia*;
- *Thermoactinomyces*;
- *Waksmania*;
- *Thermopolyspora*;
- *Micromonospora*;
- *Thermomonospora*;
- *Actinoplanes*;
- *Streptosporangium*.

Род *Streptomyces*, который считается наиболее распространенным и важным актиномицетом, продуцирует биологически активные соединения, антибиотики и внеклеточные ферменты. Бактерии участвуют в катаболизме сложных молекул и веществ, таких как лигноцеллюлоза, ксилан, целлюлоза и лигнин, которые играют важную роль в катаболизме органического вещества почвы.

Streptomyces является одним из основных известных источников биоактивных веществ, которые включают образование вторичных метаболитов в форме антибиотиков и внеклеточных ферментов, противоопухолевых и агроактивных соединений, участвующих в разложении целлюлозы и хитина.

Антагонистическая активность *Streptomyces* по отношению к возбудителям заболеваний растений обусловлена следующими признаками:

- синтез регуляторов роста растений;
- производство сидерофоров;
- производство антибиотиков;
- секреция летучих соединений;
- конкуренция за питательные вещества [1].

Например, штаммы *Streptomyces*, колонизирующие корни томатов, вызывают устойчивость к *Rhizoctonia solani*. Актиномицет смог усилить экспрессию липоксигеназы и фенилаланин-аммиачной лиазы в растениях томата. Это позволяет запускать сигнальные пути жасмоновой кислоты и фенилпропаноидов в растениях, что приводит к индуцированному защитному статусу томатов против *R. solani* [2].

Кроме того, большое разнообразие видов *Streptomyces* может устанавливать полезные взаимоотношения между растениями и микробами. В табл. 1 обобщена стимулирующая рост растений активность видов *Streptomyces*, которые получают доступ к тканям корней из почвы.

Таблица 1

Стрептомицеты, выделенные из растений или ризосферы, обладающие активностью, способствующей росту растений [3]

Виды	Растение-хозяин	Наблюдаемые эффекты у растений
<i>Streptomyces</i> sp.	Клевер	Поглощение питательных веществ
<i>Streptomyces</i> sp.	Рис, нут	Поглощение питательных веществ и рост растений
<i>Streptomyces</i> sp.	Бобы	Усиленный рост растений
<i>Streptomyces</i> sp.	Соя	Поглощение питательных веществ и рост растений
<i>Streptomyces filipinensis</i> , <i>S. atrovirens</i>	Томат	Стимулирование роста растений
<i>Streptomyces spiralis</i>	Огурец	Стимулирование роста растений
<i>Streptomyces rochei</i> , <i>S. carpinensis</i> , <i>S. thermolilacinus</i>	Пшеница	Получение сидерофора, синтез индол-3-уксусной кислоты и солюбилизация фосфата

Таким образом, бактерии рода *Streptomyces* являются наиболее известными и значимыми актиномицетами. Обладая фитопатогенными свойствами они способны предотвращать заболевания растений, а также способствовать их более лучшему развитию и росту. Это делает их перспективными агентами для разработки биопрепаратов.

Работа выполнена в рамках государственного задания для выполнения научно-исследовательских работ по теме «Разработка подходов к фиторемедиации посттехногенных ландшафтов с использованием стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPB) и «омиксных» технологий», дополнительное соглашение № 075-03-2021-189/4 от 30.09.2021 (внутренний номер 075-ГЗ/Х4140/679/4).

Литература

1. Olanrewaju O.S. Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion / O.S. Olanrewaju, O.O. Babalola // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 103. – P. 1179–1188.
2. Exploring Two Streptomyces Species to Control Rhizoctonia solani in Tomato / M. Ebrahimi-Zarandi, G.H.S. Bonjar, M. El-Shetehy et al. // Agronomy. – 2021. – V. 11. – P. 1384–1402.
3. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of Streptomyces spp. as Endophytes. / S.S.K.P. Vurukonda, D. Giovanardi, E. Stefani // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – V. 9. – P. 952–978.

Использование бактериофага Kіrov в качестве агента биоконтроля *V. cereus* в пищевых продуктах

Скорынина А.В., Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
s_an.net@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38405

Среди представителей рода *Bacillus B. cereus* является видом, наиболее часто связанным с пищевыми отравлениями [1] и представляет интерес для общественного здравоохранения, так как считается условно-патогенным микроорганизмом. Причина тому – способность вырабатывать цереулид, вызывающий рвоту, и энтеротоксины, вызывающие диарею. Также, *B. cereus* могут выделять протеолитические и липолитические ферменты, вызывающие порчу пищевых продуктов, что приносит убытки пищевым производствам.

Молочная промышленность – одно из направлений пищевой отрасли, в которой контаминация *B. cereus* несёт высокие риски. Основные пути заражения молочных продуктов *B. cereus* – загрязнение сырого молока от вымени дойных животных и загрязнение молока и продуктов посредством биоплёнок в доильном оборудовании и оборудовании для переработки молока [2]. Зарубежные исследования сырого молока выявили распространённость от 5 до 90% и концентрации до 10^7 КОЕ/мл [2]. Способность *B. cereus* выживать и расти в молочных продуктах зависит от штамма, температуры, конкурирующей микрофлоры и изменений pH. Споры *B. cereus* выдерживают режимы пастеризации, используемые при обработке молока и молочных продуктов.

Оптимальная температура роста *B. cereus* колеблется от 30 до 40 °С, хотя некоторые штаммы могут расти при 55 °С. Тем не менее, есть исследования, в которых описано, что штаммы, вызывающие рвотный синдром, имеют минимальную температуру роста 15 °С [3]. Некоторые штаммы проявляют устойчивость к более низким температурам, 4 °С, и считаются психротрофными или психротолерантными. В частности, исследование показало, что изоляты *B. cereus* из молочных продуктов адаптировались к этим условиям окружающей среды [4]. *B. cereus* может расти и в широком диапазоне pH от 4,5 до 9,5, и при минимальной активности воды для роста 0,93, и при концентрации NaCl до 7% [3]. Рост

B. cereus оптимален в присутствии кислорода, хотя микроорганизм может расти анаэробно, но в этой среде не обнаруживается продукция токсинов [3].

Рутинные подходы к предотвращению загрязнения пищевых продуктов, основанные на применении антибиотиков и консервантов, ограничены в своей эффективности из-за их токсического действия и развития резистентности бактерий. Такие методы, ввиду неспецифического действия, не подходят при производстве ферментированных продуктов, а также малоэффективны против биоплёнок.

Известны альтернативные стратегии борьбы с потенциально патогенными видами, включая использование бактериофагов в качестве агентов биоконтроля. Использование фагов рассматриваются как способ преодоления устойчивости микроорганизмов к антимикробным средствам и включено в Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ.

В этом исследовании мы изолируем и описываем новый бактериофаг Kirov, питающийся *B. cereus sensu lato*, который может быть эффективным против патогенов группы *B. cereus*.

Бактериофаг Kirov был выделен из образца почвы, собранного в Кирове, Кировская область, Российская Федерация, в 2017 году, и размножен на штамме-хозяине *B. cereus* ATCC 4342. Анализ диапазона хозяев показал, что Kirov был способен инфицировать 12 (из 42) *Bacillus*. штаммов, тогда как 25 штаммов группы *Bacillus cereus* и пять других штаммов *Bacillus* были устойчивы к фаговой инфекции. На газоне штамма-хозяина *B. cereus* ATCC 4342 Kirov образовались четкие бляшки диаметром 3–6 мм.

Анализ ПЭМ показал, что фаг обладает икосаэдрической неудлиненной головкой диаметром примерно $78,3 \pm 2,1$ нм, прикрепленной к характерному длинному несокращающемуся гибкому хвосту длиной примерно $437,6 \pm 12,1$ нм (без учета структуры базовой пластинки) и $12,3 \pm 12,3$ нм. $0,9$ нм в ширину. Хвост заканчивается базальной пластиной с выступающими фибриллярными структурами. Хвост содержит около 110 видимых полос (дискообразных структур). Фаг обладает всеми характерными морфологическими признаками сифовирусов морфотипа B1 (Ackermann 2001) [5].

Результаты анализа термостабильности свидетельствуют о том, что фаг стабилен в течение 1 ч инкубации при температурах 30 °C и 40 °C, так как титры фагов после инкубации были аналогичны титру контрольного образца, инкубированного при 4 °C. При 50 °C титр фага снижался примерно на два порядка по сравнению с контрольным образцом. Фаги не выживали при инкубации при 60 °C и более высоких температурах. Тест на pH-стабильность показал, что фаг стабилен при значениях pH от 5 до 10, но не при pH 2, 2, 3 и 4, где литическая активность после инкубации не обнаружена.

Стабильность бактериофага позволяет рассматривать его в качестве кандидата для создания фагового препарата, предотвращающего контаминацию продуктов *B. cereus*.

Известно, что матрица пищевого продукта может связывать фаги, а состав и pH продукта не отвечать оптимуму действия фага, что может препятствовать фаговой инфекции. Для оценки эффективности использования фага непосредственно в пищевых продуктах, мы провели эксперименты на молоке, контаминированном чувствительным к фагу штаммом *B. cereus* ATCC4342. Для этого 10 мл молока искусственно контаминировали *B. cereus* ATCC4342 до 10^5 КОЕ/мл, с последующим внесением фага Kirov из расчета 10^3 БОЕ/мл (MOI 0,01). В контрольную пробу вместо препарата бактериофага вносили 0,01 мл буфера SM.

По истечении 4 часов титр *B. cereus* ATCC4342 снижался до порога обнаружения менее 10^3 КОЕ/мл, по сравнению с контрольной пробой молока, без добавления фага, в которой титр бактерий достигал 10^8 КОЕ/мл. При нарастании со временем титра бактериофага в пробе, и падении титра бацилл, контроль бактериальной обсеменённости становится затруднительным, ввиду лизиса клеток бактериофагом при посеве и культивировании. Поэтому, в качестве дополнительного контроля, по истечении 6 часов исследовали активность бактериальных клеток в молоке с помощью резазурина. Для этого к 10 мл молока добавляли 1 мл основного раствора резазурина ($0,5$ мг/мл) и оценивали изменение цвета через 10 и 30 мин.

Резазурин обесцвечивается восстанавливающими ферментами бактерий в пробе молока не содержащем бактериофаг, в то время как в пробе, содержащей Kirov, цвет не меняется. Эксперимент свидетельствует о значительном различии в образцах молока количества активных клеток бактерий, что подтверждает эффективность действия бактериофага Kirov на клетки *B. cereus* ATCC4342 в молоке.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Литература

1. Pirhonen T.I., Andersson M.A., Jääskeläinen E.L., Salkinoja-Salonen M.S., Honkanen-Buzalski T., Johansson T.L. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology*. 2005 Jan 1;22(1):87-91.
2. Cressey P.J., King N.J., Soboleva T. Risk profile: *Bacillus Cereus* in dairy products. Ministry for Primary Industries; 2016.
3. Bottone E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2010 Apr;23(2):382-98.
4. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection*. 2000 Feb 1;2(2):189-98.
5. Ackermann H.W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of virology*. 2001 May;146(5):843-57.

Интенсификация культивирования и подбор условий хранения биомассы *Rhodopseudomonas palustris*

Старыгина П.А.¹, Чудакова О.О.¹, Кондратьева Т.Д.², Черкасов Р.О.²

¹ ИФПБ РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино,
staryginapolina@yandex.ru

² Компания ООО «Смарт гигиена», г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38406

Благодаря достаточно подвижному метаболизму пурпурные несерные бактерии способны использовать широкий спектр органических соединений для роста в фото- и хемогетеротрофных условиях, многие из них устойчивы к органическим и азотным загрязнениям, высокой солености, низким температурам [1, 2]. Этими свойствами обусловлено использование пурпурных несерных бактерий, в частности, *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris* в биотехнологических процессах, таких как очистка сточных вод, фильтрация воды в системах замкнутого водоснабжения, получение аминокислот.

Целью данной работы являлся подбор условий культивирования и способа хранения биомассы *Rps. palustris*. В качестве режима культивирования был выбран продленный периодический способ с подпиткой культуры титрующей средой. Первоначально в титрующей среде использовались концентрации питательных веществ, подобранные для интенсивного культивирования *Cereibacter sphaeroides* [3]. Затем, основываясь на анализе компонентов культуральной жидкости, которая отбиралась из реактора по мере роста культуры, состав среды был пересчитан в соответствии с потреблением веществ. Также изучалось влияние парциального давления кислорода (pO_2). Выращивания проводили при поддерживаемых значениях pO_2 1%, 5% и 20%. Установлено, что конечная оптическая плотность (ОД) культуры, как и вес высушенных клеток не зависят от значения pO_2 , в отличие от скорости роста культуры и времени ее культивирования. Минимальное время культивирования составило 121 час при pO_2 , равном 5%. В результате интенсификации удалось получить 19,4 г/л высушенных клеток при ОД 65 опт.ед., что на 33% и 35% больше первоначальных результатов соответственно.

Титр колониеобразующих единиц (КОЕ) полученной биомассы составлял в среднем $9,2 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г биомассы. Были подобраны оптимальные условия замораживания клеток с сохранением максимального КОЕ. Установлено, что при замораживании с контролируемой скоростью (-1 °С/мин) до -72 °С и помещением биомассы в морозильную камеру при -20 °С титр КОЕ уменьшался в 1,3 раза. Замораживание в жидком азоте показало уменьшение КОЕ в 2,5 раза. Таким образом, показано, что наибольшее количество жизнеспособных клеток сохраняется при замораживании биомассы при -20 °С. Кроме того, этот метод является наиболее экономичным и менее трудоемким. Обнаружено, что титр КОЕ при хранении биомассы при -20 °С в течение 42 дней практически не изменился. Изучено влияние ряда кри-

опротекторов (пептон, обезжиренное молоко, альгинат/сахароза, альгинат/маннитол) на титр КОЕ при лиофилизации биомассы. Показано, что как с криопротекторами, так и без них титр КОЕ уменьшился примерно в 15 раз. При хранении лиофилизованной биомассы в течение 49 дней титр КОЕ снизился примерно в 2,3 раза.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ № АААА-А17-122041200039-0 (2022) (Интенсификация культивирования *Rps. palustris*) и договора №129 от 23.12.2021 в рамках гранта ФГБУ «Фонд содействия инновациям» 4231гс1/70493 от 27.10.2021.

Литература

1. Lu G. Bio-conversion of pb from non-toxic wastewater to realize wastewater treatment: a review *Bioresour. Technol.*, 2019. Т. 278, Р. 383–399.
2. Hülsen T., Hsieh K., Batstone D.J. Saline wastewater treatment with ppb // *Water research*. – 2019. – Т. 160. – Р. 259–267.
3. Чудакова О.О. Пурпурная несерная бактерия *Sereibacter sphaeroides* – продуцент бактериохлорофилла а и ее интенсивное культивирование / Чудакова О.О., Старыгина П.А., Хуснутдинова А.Н., Лауринавичене Т.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Филоненко Е.В., Цыганков А.А.// *Биотехнология*, 2022. Т. 38, № 4. С. 7–15.

Влияние содержания углеродсодержащего субстрата в среде на накопление грибом *Trametes polyzona* SUB8447059 биомассы

Сысоева М.А., Сысоева Е.В., Прозорова И.Ш., Бычкова Е.А., Зыкова В.В.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, kuleeva.1996@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38407

В настоящее время разрабатываются технологии культивирования высших грибов, так как они являются источниками широкого спектра биологически активных веществ (БАВ). Грибы рода *Trametes* являются перспективными, так как они имеют высокую скорость роста и способны продуцировать полисахариды, фенольные вещества, пигменты, ферменты и т.д. [1]. Лекарственные препараты и биологически активные добавки (БАД) из данных базидиомицетов обладают иммуностимулирующими, противоопухолевыми, антимикробными, антиоксидантными свойствами. Наиболее изученными видами данного рода являются *Trametes versicolor* и *Trametes pubescens*. Основная часть работ направлена на исследование экстрактов, полученных из плодовых тел, а также полисахаридов этих ксилотрофов. Однако наблюдается интерес к разработке биотехнологии по получению мицелия этих грибов, выращенных различными методами культивирования [2].

Важным фактором, оказывающим влияние на накопление биомассы грибами является состав питательной среды. Для интенсивного роста мицелия необходимо подобрать оптимальный источник углерода. Известно, что грибы рода *Trametes* культивируют на различных питательных средах, таких как лиственничные и древесные опилки, на основе отваров картофеля, пивного сула и т.д. [1]. Выбор среды зависит от поставленной задачи, получения конкретных продуктов культивирования, биомассы или выделяемых из нее метаболитов.

Цель работы – изучение влияния содержания глюкозы в составе среды на основе отвара овса для повышения продуктивности гриба *Trametes polyzona* SUB8447059 по накоплению биомассы для дальнейшей разработки биотехнологий получения БАВ на ее основе.

Потребности грибов рода *Trametes* в питательных веществах отличаются не только между видами, но и штаммами. Ранее авторами [3] было показано, что оптимальной плотной средой для выращивания гриба *Trametes polyzona* SUB8447059 является отвар овса. Согласно данным литературы наилучшими углеродными субстратами для культивирования базидиомицетов рода *Trametes* является глюкоза и са-

хароза [2]. Для повышения скорости роста гриба, а также увеличения концентрации биомассы необходимо обогатить питательную среду дополнительным источником углерода, так как в отваре овса низкое содержание сахаров [4].

Для установления ростовых показателей гриб *Trametes polyzona* штамм SUB8447059 культивировали в чашках Петри при температуре 27 °С на: а) отвар на основе овса; б) отвар на основе овса с добавлением глюкозы 2,5 г/л; в) отвар на основе овса с добавлением глюкозы 5,0 г/л; г) отвар на основе овса с добавлением глюкозы 10, /л. Количество выросшей биомассы определяли гравимитрически. Мицелий снимали с поверхности агаризованной питательной среды и высушивали при 40 °С. Количество глюкозы определяли с помощью глюкозооксидазного метода после автоклавирования питательных сред. Содержание глюкозы в отваре овса составило $0,51 \pm 0,007$ мг/мл, а при внесении в питательную среду глюкозы в концентрации 10 г/л значение равняется $102,40 \pm 2,77$ мг/мл.

Ростовые показатели определяли по следующим критериям: ростовой коэффициент и среднесуточная скорость роста, которые рассчитывались по формулам [5]. Показано, что при культивировании гриба *Trametes polyzona* штамм SUB8447059 на среде с добавлением глюкозы в количестве 10,0 г/л наблюдается максимальное значение ростового коэффициента $140,9 \pm 14,2$ и среднесуточной скорости роста $5,1 \pm 0,1$ мм/сут на 8 сутки, мицелий пигментируется на 5 сутки. В то время как при культивировании на агаризованном отваре овса значения коэффициента роста и среднесуточной скорости роста составляют $100,44 \pm 2,78$ и $6,28 \pm 0,17$ мм/сут соответственно на 6 сутки [3]. Ростовые коэффициенты при выращивании гриба *Trametes polyzona* штамм SUB8447059 на плотных питательных средах с внесением глюкозы в количестве 2,5 и 5,0 г/л составляют $78,3 \pm 0,2$ и $59,3 \pm 1,0$ соответственно. Морфология роста базидиомицета *Trametes polyzona* SUB8447059 представлена на рис. 1. На среде без глюкозы и с добавлением глюкозы в количестве 10,0 г/л мицелий более плотный. На остальных средах мицелий редкий.

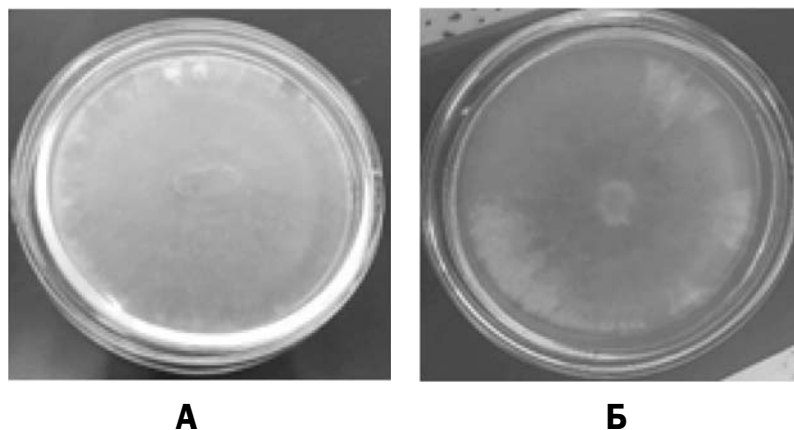


Рис. 1. Рост мицелия гриба *Trametes polyzona* SUB8447059 на 12 сутки: А – агаризованный отвар овса; Б – агаризованный отвар овса с добавлением глюкозы 10,0 г/л

В работе [1] было показано, что при культивировании на суловом агаре с добавлением 1% лиственных опилок гриба *Trametes versicolor* штамм В 18/91 максимальный ростовой коэффициент составляет 124,9.

Установлено, что внесение в питательную среду глюкозы увеличивает концентрацию биомассы практически в 2 раза по сравнению со средой на основе отвара овса без глюкозы.

Проведены опыты культивирования гриба *Trametes polyzona* SUB8447059 в трех последовательных пассажах на плотной питательной среде с добавлением глюкозы в количестве 10,0 г/л. Процесс проводили в течение пяти суток. Показано, что накопление биомассы к третьему пассажу резко снижается. Концентрация биомассы первого пассажа составляет $0,0013 \pm 0,0004$ г, второго – $0,0014 \pm 0,0003$ г и третьего – $0,0005 \pm 0,0001$ г.

Таким образом, штамм гриба *Trametes polyzona* SUB8447059 является перспективным для разработки на его основе биотехнологий получения различных вторичных метаболитов, так как не уступает по ростовым показателям другим видам *Trametes*. Показано, что добавление в питательную среду на основе отвара овса глюкозы в количестве 10,0 г/л позволяет получить более плотный мицелий и увеличить практически в 2 раза концентрацию биомассы по сравнению с отваром овса без глюкозы.

Литература

1. Ковалева Г.К. Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (vill.:fr.) bond et sing., *Ganoderma applanatum* (pers.) pat. и *Trametes versicolor* (L.:fr.) pilat: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.24 / Ковалева Гульмира Кажгалиевна. – К., 2009. 172 с. – Библиогр.: с. 143–160.
2. Ананьева Е.П. Сравнительная характеристика эндо- и экзополисахаридов *Trametes pubescens* (schumach.) pilat. / Е.П. Ананьева, С.В. Гурина, Н.В. Кожемякина // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – № 3. – С. 65–68.
3. Прозорова И.Ш. Подбор питательной среды при твердофазном культивировании гриба *Trametes polyzona* / И.Ш. Прозорова, М.А. Сысоева, Е.В. Сысоева, А.И. Хайдарова // «Пищевые технологии и биотехнологии»: материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием. – Казань, 2021. – С. 352–356.
4. Якубова О.С. Пищевая ценность напитков на основе продуктов переработки продовольственного овса / О.С. Якубова, Ю.С. Дутлякова, Р.С. Мамедова, А.А. Никонова // «Инновации в технологии продуктов здорового питания»: материалы IV Всероссийская научная конференция. – Калининград, 2017. – С. 44–50.
5. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов Юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Косогова Татьяна Алексеевна. – К., 2013. 172 с. – Библиогр.: с. 127–146.

***Pseudomonas fluorescens* как продуценты целлюлолитических ферментов**

Третьякова О.М., Третьякова Е.М.

УО «Гродненский государственный университет имени Янки Куплы»,
tretjakova_om@grsu.by

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38408

Применение иммобилизованных целлюлолитических ферментов достаточно широко распространено в различных отраслях промышленности. Так, например, их используют для получения различных сахаров из целлюлозы, улучшения качества пищевых продуктов в пищевой промышленности, для выделения полезных веществ из растений, в частности, стероидов, для медицинских целей, как добавки в корм для животных в сельском хозяйстве и др.

Продуцентами целлюлаз являются микроскопические грибы, которые наиболее часто используются при промышленном получении ферментных препаратов целлюлаз.

Бактериальная целлюлаза менее активна в сравнении с таковой у грибов, однако более термостабильна, что является их главным достоинством [1]. Чаще всего для выработки целлюлаз используются бактерии *Pseudomonas*, в особенности *Pseudomonas fluorescens*, термофильные клостридии (*Clostridium thermocellum*), *Bacillus subtilis*, представители родов *Dickey* и *Pectobacterium* [2].

Целлюлазы осуществляют гидролиз целлюлозы до различных моно- и олигосахаридов, чаще всего до глюкозы. Данные гидролитические ферменты расщепляют целлюлозу, содержащуюся в клеточной стенке плодов, до растворимой глюкозы, таким образом, увеличивая выход сока и осветляя его.

Чаще всего в промышленности применяются целлюлазы грибкового происхождения, в частности грибов рода *Trichoderma*. С помощью грибов этого рода можно получать различные ферменты за счёт их субстратной специфичности [3].

В естественных условиях соки из фруктов и ягод темнеют из-за содержания в них ферментов, различных полисахаридов, металлов. Однако при промышленном производстве сок получается светлым, так как он проходит обязательную стадию очистки и осветления, которая может проводиться различными физическими, физико-химическими и ферментативными методами.

Часто используются комплексные ферментные препараты, содержащие в себе несколько видов гидролитических ферментов, что способствует большему осветлению соков, а также увеличению его выхода за счёт гидролиза составных частей мякоти и кожицы плодов.

Ферментативное осветление соков происходит за счёт расщепления пектина, целлюлозы и других полисахаридов. Поэтому для проведения эксперимента нами были выбраны бактерии *Pseudomonas fluorescens*, в составе которых содержатся целлюлолитические ферменты, расщепляющие целлюлозу фруктов и ягод.

При проведении исследования нами была осуществлена иммобилизация клеток *Pseudomonas fluorescens* и выявлена их целлюлолитическая активность.

В качестве метода иммобилизации нами был выбран физический метод – иммобилизация в растворе альгината натрия.

Яблочный и виноградный соки для проведения эксперимента помещали в термостат (28 °С) на определённые промежутки времени, по истечении которых оценивали степень осветления соков по их оптической плотности при длине волны 340 нм, а также оценивали увеличение выхода соков.

Исходя из полученных данных было видно, что спустя 1 час в термостате яблочный сок в среднем осветлился на 8,8%, а спустя три часа – на 11%, в сравнении с контрольными образцами. Сок же из винограда осветлился на 1,9% спустя 1 час в термостате и на 5,8% спустя 3 часа.

Далее сок из яблок начал темнеть из-за интенсивного окисления железа, поэтому осветление сока при помощи бактерий *Pseudomonas fluorescens* происходило менее интенсивно. Через 5 часов в термостате яблочный сок осветлился на 9,4%, а через 7 часов, после ещё большего окисления железа, на 6,6%.

В виноградном соке под действием температуры в присутствии кислорода спустя 4–5 часов активизируются ферменты, в частности оксидоредуктазы, которые содержатся в самих плодах [4]. Поэтому спустя 5 часов сок благодаря целлюлолитическим ферментам, содержащимся в *Pseudomonas fluorescens*, был осветлён на 5,4% и только на 2,2% после 7 часов нахождения в термостате.

Далее эффективность работы иммобилизованных *Pseudomonas fluorescens* оценивали, измеряя выход сока. Спустя 1 час нахождения яблочного и виноградного соков их объём не увеличился, тогда, как спустя 3 часа увеличение выхода сока было максимальным – на 3,0%. Далее выход снижался – объём обоих видов сока увеличился только на 2,5%, что обусловлено уменьшением ферментативной активности клеток и испарением сока под действием температуры.

Таким образом, можно сделать вывод, что наибольшую целлюлолитическую активность иммобилизованные бактерии *Pseudomonas fluorescens* проявляют через 3 часа после нахождения их в яблочном и виноградном соках при температуре 28 °С, что было выявлено экспериментально.

Иммобилизованные клетки бактерий *Pseudomonas fluorescens* возможно использовать при осветлении и увеличении выхода виноградного и яблочного соков за счёт продукции целлюлолитических ферментов.

Литература

1. Отбор продуцентов, характеристика целлюлазы и бета-галактозидазы экстремально термофильных бактерий / Earthpapers [Электронный ресурс]. – Санкт-Петербург, 2017. – Режим доступа: <https://earthpapers.net/otbor-produtsentov-harakteristika-tsellyulazy-i-beta-galaktozidazy-ekstremalno-termofilnyh-bakteriy>. – Дата доступа: 20.03.2022.
2. Разложение природных веществ. Целлюлоза / Микробиология [Электронный ресурс]. – Санкт-Петербург, 2009. – Режим доступа: https://micro.moy.su/publ/obshhaja_mikrobiologija/razlozhenie_prirodnykh_veshhestv/celljuloza/17-1-0-163. – Дата доступа: 20.03.2022.
3. Русь О.Б. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс]: практикум / О.Б. Русь, А.М. Ходосовская. – Минск: БГУ, 2011. – Режим доступа: <http://www.bio.bs.u.by/molbiol/files/biotechnologie-practical2011.pdf/>. – Дата Доступа: 16.05.2022.
4. Превращения в винограде – измерение активности фермента / Всё о винограде [Электронный ресурс]. – Москва, 2022. – Режим доступа: <https://vinograd.info/knigi/teoriya-i-praktika-vinodeliya/prevrascheniya-v-vinograde-3.html>. – Дата доступа: 08.05.2022.

Биолюминесцентный сенсор на основе G-квадруплекса для обнаружения специфических последовательностей нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов

Филатов П.В., Горбенко Д.А.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург,
filatov@scamt-itmo.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38409

На сегодняшний день своевременная и точная диагностика заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, остается одной из ключевых задач в медицине. В последние десятилетия для обнаружения маркерных участков последовательностей нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов был разработан ряд эффективных методов, например, полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR) и лигазная цепная реакция (LCR). Однако они имеют несколько критических недостатков таких, как высокая стоимость оборудования, необходимость в высококвалифицированном персонале и длительность проводимого анализа. Поэтому актуальной является задача по созданию улучшенных диагностических тестов для развивающихся стран и ограниченных условий тестирования, которые должны удовлетворять критериям Всемирной Организации Здравоохранения «ASSURED». Их можно резюмировать следующим образом: чувствительные, специфичные, удобные для пользователя, быстрые и надежные, не требующие оборудования и доставляемые конечным пользователям [1]. Важно, что конечная система должна быть при этом сопоставима по чувствительности с классическими методами диагностики.

Одним из перспективных методов обнаружения целевых нуклеиновых кислот являются системы на основе гуаниновых квадруплексов (G-квадруплексов) с пероксидазной активностью [2]. G-квадруплексы представляют собой четырехцепочечные структуры нуклеиновых кислот, которые образованы водородными связями четырех гуаниновых оснований в G-тетрадах. Они могут образовывать внутри- и межмолекулярные структуры, стабилизированные тремя или более G-тетрадами. Сейчас существует несколько стратегий использования таких систем, которые основаны на разных видах репортерных проб (проб, сообщающих о наличии сигнала обнаружения): флуоресцентных [3], люминесцентных [4], колориметрических [5] и других. В данной работе будет предложен метод, основанный на высокочувствительной регистрации люминесцентного сигнала, поскольку при его использовании нет необходимости в лабораторном оборудовании, а ожидаемая чувствительность метода составит десятки нМ. Также существуют предпосылки по развитию данной системы, для которой в перспективе не понадобится какое-либо оборудование, поскольку люминесценцию можно обнаружить невооруженным глазом. Однако на начальных этапах работы для детектирования люминесценции и фундаментального увеличения чувствительности и селективности системы будет использоваться компактное устройство «lab-on-chip».

В качестве тестовой системы разработан зонд, который использует два ДНК-плеча, которые, в свою очередь, гибридизуются с анализируемым фрагментом нуклеиновой кислоты и образуют G-квадруплексную структуру. Далее следует связывание гемина G-квадруплексом, с образованием биокатализатора генерации хемилюминесценции в присутствии H_2O_2 и люминола.

В качестве анализируемого агента был выбран участок рибосомальной РНК патогенного микроорганизма *Streptococcus pneumoniae*, поскольку пневмококковая инфекция, вызывающая лихорадку, нарушения дыхания, кашель, боль в груди и другие симптомы, является одной из общемировых проблем для здравоохранения.

Литература

1. Increasing Access to Diagnostics Through Technology Transfer and Local Production [Электронный ресурс]: World Health Organization (WHO). – Режим доступа: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjVvrrChYv7AhUHS0EAHS3dBtCQFnoECBoQAQ&url=https%3A%2F%2Fapps.who.int%](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjVvrrChYv7AhUHS0EAHS3dBtCQFnoECBoQAQ&url=https%3A%2F%2Fapps.who.int%2F)

- 2Firis%2Frest%2Fbitstreams%2F110131%2Fretrieve&usg=AOvVaw2rjqSpdcxkz_0HJWZEFoiZ – Дата обращения 29.10.2022.
2. *Ghahremani Nasab, Maryam, et al.* Interaction of hemin with quadruplex DNA // *Journal of biological physics*. – 2017. – Т. 43. – №. 1. – С. 5–14.
 3. *Fang G. et al.* A bright FIT-PNA hybridization probe for the hybridization state specific analysis of a C→U RNA edit via FRET in a binary system // *Chemical science*. – 2018. – Т. 9. – №. 21. – С. 4794–4800.
 4. *Ying H. et al.* Diagnostic value of quantification of circulating free DNA for gall bladder cancer using a chemiluminescence DNA biosensor system based on DNA G-quadruplex/hemin enzyme // *Translational Oncology*. – 2021. – Т. 14. – № 1. – С. 100928.
 5. *Gorbenko D.A. et al.* DNA nanomachine for visual detection of structured RNA and double stranded DNA // *Chemical Communications*. – 2022. – Т. 58. – №. 35. – С. 5395–5398.

Циклодекстрины в лакказном окислении стероидных спиртов: от ингибирования к синтезу

Хомутов С.М., Шутов А.А., Довбня Д.В., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН),
skhomutov@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38410

Биокаталитические процессы функционализации стероидных структур являются перспективной альтернативой многостадийным химическим синтезам. В качестве «зеленых» энзимных оксидантов особое место занимают лакказы (ЕС 1.10.3.2, оксидоредуктаза кислорода), представляющие собой медьсодержащие оксидазы, способные мягко окислять электронно-насыщенные субстраты с одновременным восстановлением молекулярного кислорода до воды [1]. Использование лакказ медиаторных систем (ЛМС), так называемых «радикальных кузниц», обеспечило региоспецифическую оксифункционализацию 3 β -ол-5-ен-стероидов, таких, как дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и прегненолон [2]. Разработка препаративных синтезов стероидов на основе окисления с участием лакказ медиаторных систем неизбежно сталкивается с проблемой доступности субстрата из-за чрезвычайно низкой растворимости стероидов в воде. Возникает необходимость создания реакционной среды, обеспечивающей транспорт субстрата, и в то же время не вызывающей инактивации фермента. Создание водных биоконверсионных сред с амфифильными свойствами возможно на основе водорастворимых циклических олигосахаридов – циклодекстринов (ЦД). ЦД образуют растворимые комплексы включения с гидрофобными стероидами по типу «гость-хозяин», в которых комплексная форма гостя служит «подвижным депо» гидрофобного субстрата в условиях биоконверсии.

Целью данной работы была оценка перспектив использования водных растворов метилированного β -циклодекстрина (мЦД) в качестве реакционной среды для оксифункционализации лакказ медиаторными системами гидрофобных нефенольных стероидов.

Изучено влияние мЦД на окисление 3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-она (ДГЭА) и 7 α - и 7 β -гидроксипроизводных ДГЭА, а также малорастворимого первичного стероидного спирта – 20-гидроксиметил-прегн-4-ен-17-она (ГМП) лакказными системами с медиаторами радикального и ионного типов (рис. 1). ЛМС включали лакказу *Trametes versicolor* и 1-гидроксибензотриазол или ТЕМРО в качестве окислительно-восстановительных медиаторов. Единственный продукт – 3 β -гидроксиандрост-5-ен-7,17-дион – был обнаружен в процессе окисления ДГЭА с участием лакказ медиаторной системы при концентрациях субстрата в пределах растворимости. Кинетические исследования показали, что образование мЦД-комплекса с ДГЭА приводило к снижению концентрации реакционной формы субстрата и ингибировало биоконверсию. Ингибирующий эффект ЦД-комплексобразования, по-видимому, свя-

зан с перераспределением электронной плотности в молекуле ДГЭА, что сопровождалось частичной дезактивацией аллильного (С-7) водорода. Это препятствовало его отщеплению и становилось лимитирующей стадией окисления ДГЭА лакказой. При использовании концентраций ДГЭА, превышающей растворимость стероида в воде, наряду с 7-кето-ДГЭА образовывались 3 β ,7 α - и 7 β -ОН-ДГЭА. Оба изомера 7 α -ОН- и 7 β -ОН- ДГЭА были эффективно преобразованы в 7-кето-ДГЭА с помощью лакказ медиаторной системы в присутствии мЦД.

Важной задачей было выяснение возможного участия в качестве субстрата реакции циклодекстриновой комплексной формы малорастворимых стероидов с короткой 17-замещенной боковой цепью (например, ГМП) при их ЛМС окислении, что позволило бы расширить возможности ЛМС как инструмента синтеза. Боковая цепь таких стероидов доступна для атак реактивной окисленной формой медиатора ЛМС. Для ГМП комплексообразование не препятствовало окислению гидроксильной группы боковой цепи стероида. Единственный продукт окисления лакказ медиаторной системой был идентифицирован как прегн-4-ен-3-он-20-карбальдегид (20-ПОА) – продукт окисления первичной гидроксильной группы прегнановой боковой цепи (рис. 1). Скорость накопления продукта возрастала при повышении концентрации мЦД. Проведен препаративный синтез 20-ПОА с ЛМС окислением ГМП в мягких условиях в растворах мЦД. Масс-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектры кристаллического продукта подтвердили брутто-формулу, молекулярную массу и структуру, соответствующие 20-ПОА.

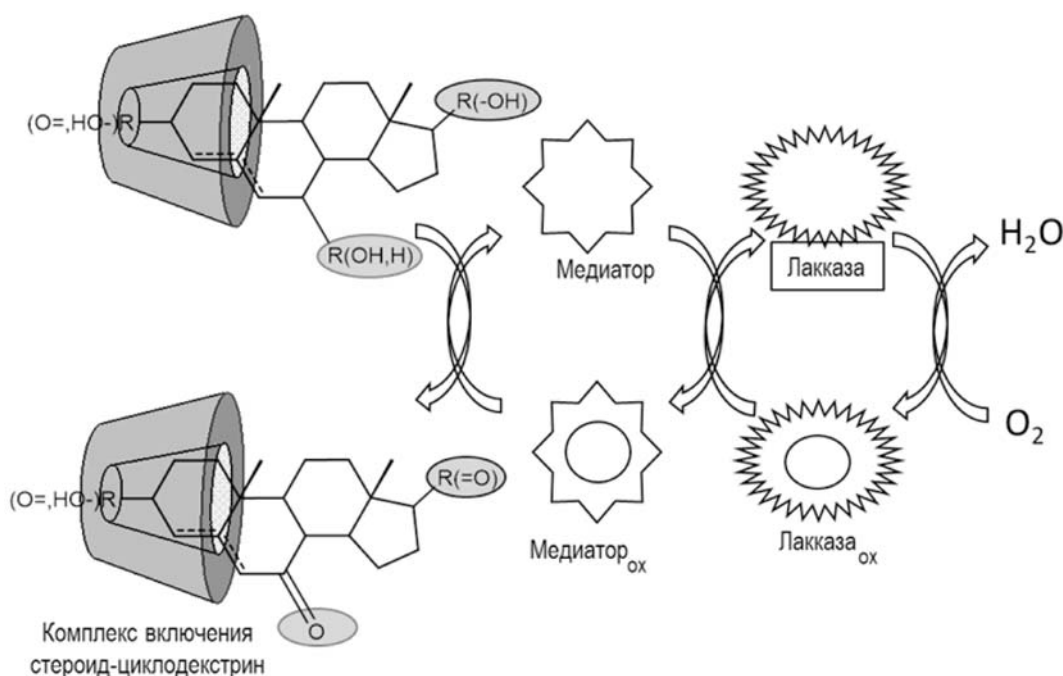


Рис. 1. Окисление ЛМС стероидных спиртов в присутствии мЦД

Таким образом, использование мЦД-комплексной формы ГМП в качестве субстрата позволило впервые получить ферментативным путем стероидный альдегид 20-ПОА.

Результаты способствуют пониманию лакказной конверсии стероидов и могут рассматриваться как альтернатива химическому окислению первичных гидроксильных групп стероидных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

Литература

1. Bassanini I., Ferrandi E.E., Riva S. and Monti D. Catalysts 2020, 11, 26, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.3390/catal11010026.
2. Khomutov S.M., Shutov A.A., Chernikh A.M., Myasoedova N.M., Golovleva L.A. and Donova M.V. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 123, 47–52, DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.1016/j.molcatb.2015.11.004.

Присутствие почвенных термофильных бактерий-нефтедеструкторов в нефтяных загрязнениях вблизи ж/д станции Кушелевка

Хорунжая А.В.¹, Журавлева А.С.², Баженова И.А.¹

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Институт биомедицинских систем и биотехнологий,
khorunzhaia.av@gmail.com

² ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38411

Важной проблемой экологии является загрязнение почв нефтепродуктами, нарушающее водный и газовый режим почв, состав почвенной микрофлоры, состояние растительного покрова и другие свойства экологических ландшафтов [1]. Известно, что загрязнение почв и грунтов нефтепродуктами в малых дозах стимулирует рост разнообразия и числа бактерий-нефтедеструкторов [2]. Поскольку физическое удаление загрязненного почвогрунта существенно травмирует ландшафт, то, несмотря на его эффективность, внимание исследователей привлекает поиск альтернативных экологичных методов устранения нефтяных загрязнений почв. Среди них особенно многообещающим выглядит внесение препаратов на основе микроорганизмов-деструкторов нефти и ее производных, особенно, при слабом загрязнении [2–4]. Как перспективные рассматривают препараты на основе мезофильных и термофильных быстрорастущих нефтеокисляющих бактерий. Умеренно-термофильные бактерии с оптимальной температурой роста в диапазоне 45–60 °С, встречающиеся в умеренном климате, являются привлекательным объектом для разработки биопрепаратов для стран с умеренным и холодным климатом. Все это делает актуальным изучение термофильных бактерий-нефтедеструкторов из грунтов и почв, расположенных в условиях с высокой антропогенной нагрузкой. Таким образом, целью данной работы было выявление термофильных углеводородокисляющих бактерий в загрязненных почвогрунтах железной дороги рядом с ж/д станцией Кушелевка, Санкт-Петербург.

Для исследования брали среднюю пробу из 5 точек на площади 1 м², отбор делали на глубине 0–5 см. Координаты каждой точки фиксировали и составляли описание почвы. Образцы почвогрунта высеивали на модифицированную жидкую питательную среду Ворошиловой-Диановой (ВД) [5] для дальнейшего определения присутствия термофильных бактерий и получения накопительных культур в усреднённых пробах. Культивирование бактерий проводили в термостате при постоянной температуре 60 °С. Далее проводили серию посевов. Микроорганизмы в первом посеве культивировали на среде ВД без внесения органического субстрата с последующим внесением в среду нефть в расчете 10 мл на 1 л. Для

Таблица

Количественные показатели, характеризующие рост микроорганизмов в пробах Q2–Q5 на питательных средах с добавлением ацетата Na и бензоата Na.

Параметры проб/№ пробы	Q2		Q3		Q4		Q5	
	ацетат Na	бензоат Na	ацетат Na	бензоат Na	ацетат Na	бензоат Na	ацетат Na	бензоат Na
Числовая характеристика (ЧХ)	322	321	333	322	310	311	311	332
Наиболее вероятное число микроорганизмов	20	15	140	20	4,5	7,5	7,5	15
Количество микроорганизмов в 1 см ³ исходной суспензии	20,0·10 ⁵	15,0·10 ¹	140,0·10 ⁷	20,0·10 ³	4,5·10 ⁶	7,5·10 ⁴	7,5·10 ⁴	110,0·10 ⁵
Средняя оптическая плотность	0,4	0,25	0,3	0,2	0,15	0,2	0,1	0,3

следующих посевов использовали среду ВД, с внесением ацетата Na, во втором варианте готовили среду ВД с последующим внесением в неё бензоата Na. Культивирование бактерий также проводили при температуре 60 °С. Рост бактерий в жидкой среде определяли при помощи измерения оптической плотности среды на денситометре [2].

В пробах, высеянных на средах с добавлением ацетата или бензоата определяли с помощью таблицы Мак-Креди наиболее вероятное число микроорганизмов (табл.).

Оптическая плотность исходных культур следующая: Q2-1,2 abs, Q3-0,9 abs, Q4 -1 abs, Q5-0,8 abs.

Полученные данные позволили сделать следующие выводы:

1. Количество термофильных микроорганизмов, разлагающих ацетат Na, в пробах превышает число бактерий, способных к разложению бензоата Na.

2. Наибольшее количество термофильных бактерий нефтедеструкторов содержала проба Q3 (почва на месте взятой пробы внешне была недавно сильно загрязнена нефтепродуктами) – $140,0 \cdot 10^7$ количество микроорганизмов в 1 см³ исходной суспензии в среде с добавлением ацетата, $20,0 \cdot 10^3$ в среде при добавлении бензоата Na. Содержание термофильных бактерий-нефтедеструкторов в контрольной пробе также находится на достаточно высоком уровне. Возможно, в контрольной пробе также находятся нефтедеструкторы, т.к. участок сбора пробы находился вблизи ж/д станции, т.е. возможно постоянное, но небольшое загрязнение нефтепродуктами.

В пробах почв были обнаружены термофильные микроорганизмы-нефтедеструкторы, способные к росту на индивидуальных углеводородных субстратах с добавлением ацетата Na и бензоата Na в качестве единственного источника углерода и энергии. В дальнейшем предполагается проведение аналогичных экспериментов с использованием других углеводов и выделение чистых культур термофильных бактерий, перспективных для создания микробных консорциумов, эффективно разлагающих нефтепродукты.

Литература

1. Кочетова Ж.Ю., Кравченко А.А., Верхов С.В. Влияние нефтезагрязнения на почву и способы ее рекультивации: Булатовские чтения. Сборник статей-2019.
2. Журавлева А.С., Волкова Е.Н., Галушко А.С. Термофильные аэробные органогетеротрофные бактерии антропогенно измененных территорий Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Экол. генетика, 2021. Т. 19. № 1. С. 47–58.
3. Andreolli M., Albertarelli N., Lampis S., et al. Bioremediation of diesel contamination at an underground storage tank site: a spatial analysis of the microbial community // World J Microbiol Biotechnol. 2016. Vol. 32. P. 6.
4. Ветрова А.А. Биодegradация углеводов нефти плазмидсодержащими микроорганизмами деструкторами: автореф. дисс. канд. биол. наук. – М.: МГУ, 2010. – 10 с.
5. Ворошилова А.А., Дианова Е.В. Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях // Микробиология, 1952. Т. 21. № 4. С. 408–415.

Совместное выделение биологически ценных продуктов из пурпурных несерных бактерий

Чудакова О.О., Ашихмин А.А., Старыгина П.А.

ИФПБ РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пушкино, Московская область,
Chuda94@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38412

Пурпурные несерные бактерии являются продуцентами многих биологически значимых соединений, среди которых можно выделить бактериохлорофилл *a*, каротиноиды и убихинон Q10. Обычно методики их получения направлены на получение одного целевого продукта. На данный момент в литера-

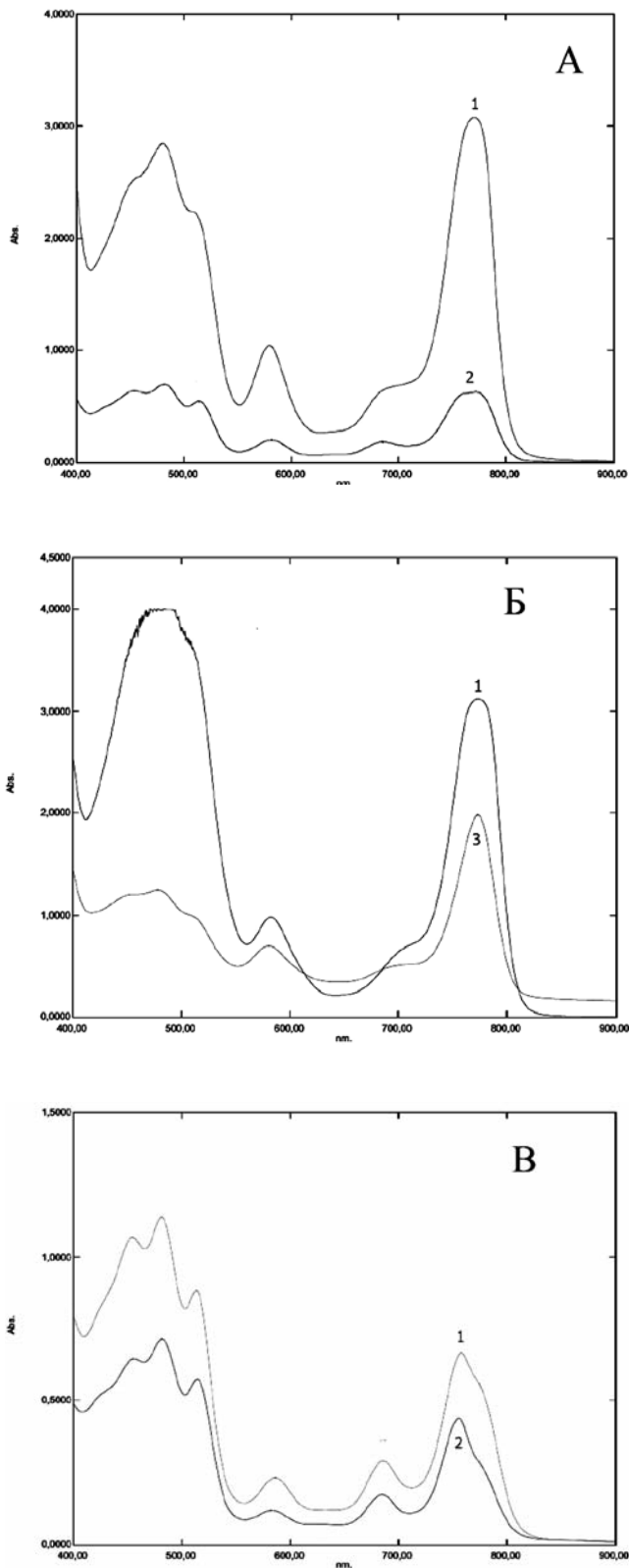


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов из биомассы *C. sphaeroides* методами ацетон-метанольной (А), гексан-изопропанольной (Б) и хлороформ-метанольной (В) экстракции. 1 – экстракт после выделения, 2 – экстракт через 2 суток, 3 – экстракт через 2 месяца. На графике А и В видно появление пика бактериофеофитина (748 нм)

туре нет данных о методике совместного выделения подобных веществ из биомассы пурпурных несерных бактерий в препаративных количествах. Поэтому разработка метода их совместного выделения является актуальной задачей.

Целью данной работы было разработать методику совместного получения биологически ценных продуктов из бактериальной биомассы. В качестве объекта исследования использовали биомассу бактерии *C. sphaeroides* штамм ВКМ В-3534Д.

Экстракция веществ проводилась тремя способами из целых клеток и клеток, разрушенных с использованием ультразвука. Первым из способов была ацетон-метанольная экстракция. В пробирку с клетками добавляли смесь ацетона и метанола в соотношении 7:2, перемешивали и выдерживали в темноте в течение 5 мин с последующим центрифугированием. Полученный экстракт переводили в гексан для дальнейших стадий. Второй способ заключался в добавлении к клеткам смеси гексан: изопропанол в соотношении 2:1, перемешивали и выдерживали при 50 °С в течение 15 мин, после чего центрифугировали и собирали верхний окрашенный слой. Растворитель упаривали и полученную пленку растворяли в гексане для проведения дальнейших стадий. Третьим способом было добавление к клеткам смеси хлороформ: метанол в соотношении 1:2, с дальнейшим перемешиванием и центрифугированием. Супернатант сливали в другую пробирку. Затем к клеткам добавляли смесь хлороформ: метанол (1:2) с 1% KCl, перемешивали, центрифугировали и добавляли в пробирку с первым супернатантом. Далее добавляли к супернатанту хлороформ и 1% KCl, перемешивали, центрифугировали и собирали нижний окрашенный слой. Растворитель упаривали и полученную пленку растворяли в гексане для проведения дальнейших стадий. Полученные экстракты в гексане наносили на колонку с силикагелем с размером частиц 63-200 мкм. Для разделения использовали смесь гексан:ацетон в соотношении 93:7. На данном этапе отделяли бактериохлорофилл от остальных веществ в экстракте. Последней стадией было разделение каротиноидов и убихинона Q10 с использованием ВЭЖХ в системе ацетонитрил: этанол в соотношении 3:1 без градиента.

В процессе выделения веществ не было замечено различия между использованием целых и разрушенных с помощью ультразвука клеток.

Было обнаружено, что при экстракции веществ первым и третьим методами происходило быстрое окисление бактериохлорофилла *a*. При экстракции вторым методом окисление бактериохлорофилла *a* не происходило даже в течение 2 месяцев.

Таким образом, разрабатываемый подход позволяет получить из биомассы пурпурных несерных бактерий следующие вещества – каротиноиды (сфероиденон), убихинон Q10 и окисленную форму бактериохлорофилла *a* – бактериофеофитин.

Биоразнообразие эндофитных микроорганизмов плодов яблони (*Malus domestica*)

Шабля А.С.¹, Ванькова А.А.¹, Дренова Н.В.²

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
институт агробиотехнологии, Москва, Россия,
schablya.anna@yandex.ru

² ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Быково, Россия

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38413

Микроорганизмы распространены повсеместно и являются неотъемлемой частью биоценоза. Эндофитные микроорганизмы развиваются во внутренних тканях растений, не вызывая его заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на развитие растения – хозяина. Напротив, они способны стимулировать рост растений и обеспечивать их защиту от фитопатогенов за счет синтеза различных полезных метаболитов. Эндофитные микроорганизмы колонизируют те же экологические ниши, что и фитопатогенные, поэтому рассматриваются как перспективный агент биоконтроля. Микроорганизмы находят все более широкое применение в сельском хозяйстве. Так, предпосевная обработка семян биопрепаратами на основе бактерий-антагонистов приводит к увеличению всхожести семян, снижает заболеваемость растений бактериальными и грибными гнилями. Микоризные грибы улучшают минеральное питание и снабжение растения влагой. Многие бациллы продуцируют биологически активные вещества и используются в биопрепаратах для защиты и стимулирования роста растений [2, 4, 5].

Яблоня считается самой распространённой плодовой культурой на территории России – она занимает свыше 70% общей площади садов. Россия входит в первую десятку стран по потреблению яблок, при этом значительная часть урожая предназначена для длительного зимнего хранения. В связи с этим, предотвращение микробной порчи продукции и поддержание ее естественного иммунитета являются актуальными задачами [1, 3].

Цель исследования – изучить биоразнообразие эндофитных микроорганизмов плодов яблони (*Malus domestica*). Объектами исследований служили плоды яблони поздних сортов «Алеся», «Вербное», «Орловский пионер», «Московское позднее», предназначенные для длительного хранения. Отбор образцов проводили на территории Мичуринского сада РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Из внутренних запасующих тканей плодов методом посева на глюкозопептонную среду было выделено 8 штаммов бактерий и 12 штаммов грибов, определено их обилие и частота встречаемости, проведена идентификация бактерий методом классической ПЦР с использованием универсальных праймеров для прокариот – 8UA/519R к участку гена 16S рРНК, грибов – по морфологическим признакам. Методом совместного культивирования на питательной среде определена антагонистическая способность выделенных видов бацилл по отношению к возбудителю бактериального ожога плодовых культур *Erwinia amylovora*.

Установлено, что в плодах яблони изучаемых сортов обитают эндофитные микроорганизмы, общая численность которых составила: сорт Алеся – $8,82 \cdot 10^4$ КОЕ/г; сорт Вербное – $7,24 \cdot 10^4$ КОЕ/г; сорт Орловский пионер – $1,32 \cdot 10^3$ КОЕ/г; сорт Московское позднее – $1,85 \cdot 10^2$ КОЕ/г. В составе эндофитного сообщества плодов всех изученных сортов выявлены бактерии и грибы с доминированием бактерий. Эндофитное сообщество плодов яблони сортов Алеся и Вербное имеет сходную структуру. Доминирует *Acinetobacter sp.* (обилие 91,6–94,9%, частота встречаемости 66–100%). Бациллы представлены видом *Bacillus licheniformis* (обилие 1,6–94,7%, частота встречаемости 16–100%). Обнаружены микроми-

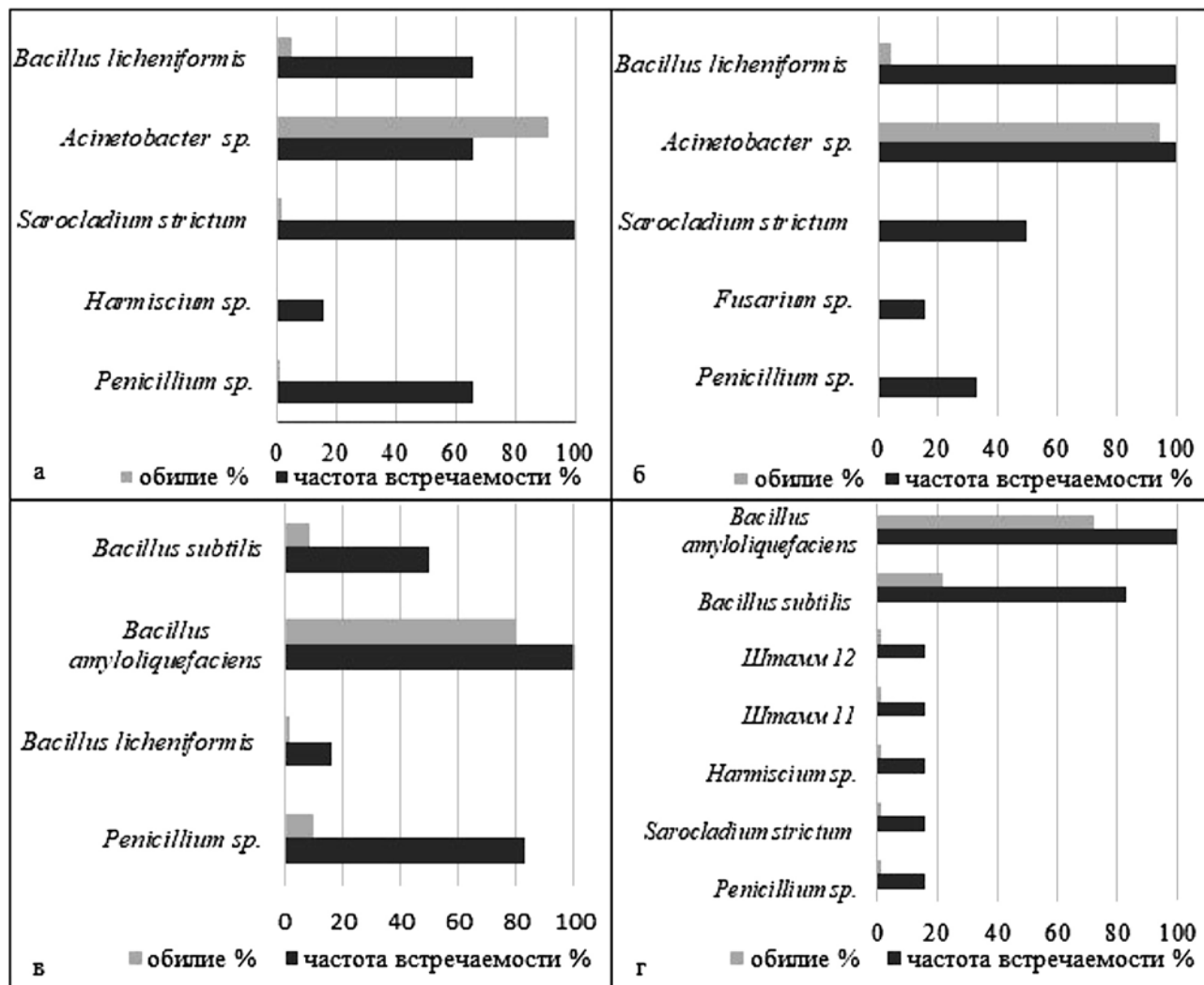


Рис. Состав эндофитных микроорганизмов в плодах яблоки сорта «Алеся» (а), «Вербное» (б), «Орловский пионер» (в) и «Московское позднее» (г)

цеты *Sarocladium strictum* и представители рр. *Penicillium*, *Harmiscium* и *Fusarium*, обилие которых не превышало 3% (рисунок, а, б). В плодах сортов Орловский пионер и Московское позднее доминировала *B. amyloliquefaciens* (обилие 72–80%, частота встречаемости 100%), субдоминантное положение занимала *B. subtilis*. Состав грибов аналогичен первым двум сортам, обилие их очень мало (рисунок, в, г), однако все обнаруженные грибы являются фитопатогенами.

Установлено, что *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* проявляют антагонистические свойства по отношению к *Erwinia amylovora* – возбудителю бактериального ожога плодовых культур. Выделенные бациллы *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* обладают ростостимулирующим и защитными свойствами и перспективны для использования в агробиотехнологиях.

Литература

1. Авилова С.В., Грызунов А.А., Ванькова А.А. 2014 Влияние низких температур хранения на микробиологические и физико-химические показатели плодов яблок. Холодильная техника. (9) 54–60.
2. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 19–32.
3. Гусева И.Н. 1991 Яблоня в вашем саду (Москва: Изд-во Моск. ун-та).
4. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 2. – С. 207–224.

5. Vankova A.A., Drenova N.V., Sviridova L.A., Golubkin G.A. ENDOPHYTIC MICROORGANISMS OF APPLE FRUIT (MALUS DOMESTICA). В сборнике: International Scientific and Practical Conference «Modern Trends in Science, Innovative Technologies in Vineyards and Wine Making» (MTSITVW2021). International Scientific and Practical Conference. 2021. С. 07004.

Определение фитопатогенности культивируемых бактерий-антагонистов *Erwinia amylovora*

Шабунина Д.В.¹, Дренова Н.В.², Кондратьев М.О.², Джалилов Ф.С.³

¹ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва,
da-wuta@mail.ru

² ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Быково, Раменское,
drenova@mail.ru

³ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38414

Возбудитель бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al.) – ограниченно распространенный карантинный объект для территории ЕАЭС. Заболевание считается одной из серьезнейших проблем плодоводства, приводя к потерям урожая и гибели плодовых и декоративных растений семейства *Rosaceae*. К настоящему времени патоген выявлялся не менее, чем в 20 регионах Европейской части РФ [1]. Несмотря на карантинные фитосанитарные меры и мероприятия по их локализации и ликвидации, площади очагов ежегодно увеличиваются. Широкое распространение растений-хозяев затрудняет ликвидацию очагов возбудителя и в большинстве случаев препятствует применению химических пестицидов для снижения вредоносности заболевания.

Антагонистические микроорганизмы, ассоциированные с сельскохозяйственными растениями, являются естественными компонентами сообщества и широко используются в мире для защиты от фитопатогенов. Активность против *E. amylovora* описана у бактерий рр. *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* и др. [1]. Против возбудителя бактериального ожога разработаны биопрепараты на основе бактерий рр. *Pseudomonas* [2], *Pantoea* [3] и др. В РФ до настоящего времени вопрос использования антагонистического потенциала местных микробных сообществ для защиты от возбудителя не рассматривался. В рамках приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития РФ п. 20д (противодействие биогенным источникам опасности для общества, экономики и государства) и п. 20г (переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты, создание безопасных и качественных продуктов питания), разработка отечественных биологических препаратов для борьбы с бактериальным ожогом представляется крайне необходимой и своевременной.

На предыдущем этапе работы были протестированы 234 бактериальных изолята из коллекции ФГБУ «ВНИИКР», отобранных как в очагах бактериального ожога, так и в свободных зонах на территории РФ в период с 2013 по 2021 гг. Нами были определены антагонистические изоляты, способные проявлять заметные бактерицидные или бактериостатические свойства в отношении *E. amylovora*. Было выделено 59 изолятов, подавляющих рост *E. amylovora* в зоне от нескольких до 20 мм и более. Наиболее активные антагонистические изоляты, подавляющие рост культуры *E. amylovora* в зоне более 10 мм, относились к родам *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Rahnella*, *Erwinia*, *Staphylococcus* [1].

Цель исследования

Определение фитопатогенности антагонистических бактериальных изолятов из коллекции ФГБУ «ВНИИКР» в отношении *Erwinia amylovora* методом реакции гиперчувствительности на листьях табака.

На данном этапе определяли фитопатогенные свойства 55 отобранных бактериальных изолятов с помощью теста на реакцию гиперчувствительности (РГЧ) на листьях табака. Изоляты, хранившиеся при температуре -80°C в пептонно-дрожжевом глюкозном бульоне с добавлением глицерина, культивировали в течение суток на пептонно-дрожжевом глюкозном агаре (ПДГА). Готовили бактериальную суспензию в концентрации около 10^9 КОЕ/мл в дистиллированной воде. Проводили инокуляцию листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.) суспензией каждого изолята в 2-кратной повторности, вводя ее с помощью стерильного шприца без иглы с нижней стороны листовой пластинки в паренхиму между жилками (рисунок). В качестве положительного контроля использовали суточную культуру *E. amylovora* (штамм СФВР 1430), в качестве отрицательного контроля – дистиллированную воду. Растения помещали в полиэтиленовый пакет для создания высокой влажности воздуха и инкубировали в течение 5 суток при комнатной температуре. Проверляли на наличие некрозов после 24–48 часов; наличие хлорозов рассматривалось как неспецифическая реакция.

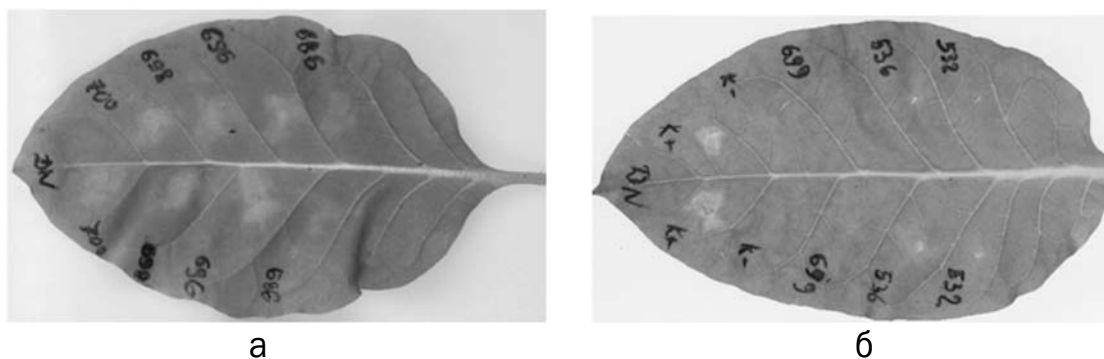


Рис. Реакция гиперчувствительности на листьях табака в результате инокуляции бактериальными изолятами

В результате исследования положительной реакции гиперчувствительности не было выявлено ни у одного бактериального изолята. Слабый хлороз (рисунок, а) вызывали 25 или 47% изолятов. Среди них бактерии pp. *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *E. billingiae*, *P. fluorescens* group, *Anthrobacter Micrococcus*. 29 или 53% изолятов, относящихся к pp. *Gluconobacter*, *Rahnella*, *Pseudomonas* и др. показали отрицательную реакцию (рисунок, б). В целом, наиболее активные антагонистические бактериальные изоляты (*Rahnella*, *Gluconobacter*, *Staphylococcus*) не вызывали образования некрозов и хлорозов. Бактерии р. *Staphylococcus* могут вызывать болезни человека и животных, поэтому не будут использованы для дальнейшей разработки биопрепаратов.

На основании РГЧ в коллекции не обнаружено патогенных бактериальных изолятов. На следующем этапе работы планируется испытание фитопатогенности активных изолятов на растениях-хозяевах.

Литература

1. Дренова Н.В., Шабунина Д.В., Кондратьев М.О., Джалилов Ф.С. Состав и антагонистические свойства микробиоты культурных и дикорастущих растений-хозяев возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora* в Российской Федерации // Материалы Третьей Всероссийской конференции с международным участием «Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике». Москва, 11–15 апреля 2022 г. – Москва: ГБС им. Н.В. Цицина РАН, 2022. – С. 57–58.
2. Cabrefiga J., Bonaterra A., Montesinos E. (2007) Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Int Microbiol* 10:123–132.
3. Kamber T., Smits T.H., Rezzonico F., & Duffy B. (2012). Genomics and current genetic understanding of *Erwinia amylovora* and the fire blight antagonist *Pantoea vagans*. *Trees*, 26(1), 227–238.

Морфолого-культуральная и физиолого-биохимическая характеристика молочнокислых бактерий виноделия Республики Крым

Шаламитский М.Ю., Танащук Т.Н.

Всероссийский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН,
mshalamitskiy@yahoo.com

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38415

Молочнокислые бактерии (МКБ) значительно влияют на качество получаемых виноматериалов. Они могут оказывать как положительное воздействие, снижая титруемую кислотность, преобразуя яблочную кислоту в молочную, так и отрицательное, вызывая заболевания и пороки вин. Многочисленные работы по изучению биоразнообразия МКБ и их применения в виноделии указывают на важность изучения их экологии, а также физиолого-культуральных и биохимических свойств.

При проведении исследований были использованы подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия и энохимии [1, 2]. Условия культивирования устанавливали в соответствии с рекомендациями по оценке технологических свойств молочнокислых бактерий виноделия [3]. При исследовании использовали классическую методологию, основанную на культивировании микроорганизмов на селективных питательных средах с последующей идентификацией штаммов, выделенных с чашек с агаром. Работы по родовой идентификации отобранных изолятов МКБ проводили, используя методические подходы, описанные в работе Квасникова и Нестеренко [4] по совокупности признаков: морфолого-культуральным признакам (форма клеток и колоний, расположение клеток) и физиолого-биохимическим (окраска по Граму, способность к образованию каталазы, молочной кислоты, образованию газа из глюкозы).

Для поиска МКБ за период 2017–2021 гг. было обследовано около 1200 образцов винограда и виноматериалов из виноградо-винодельческих хозяйств Крыма. Для увеличения вероятности выделения природных изолятов МКБ, способных развиваться в вине, исследовали сброженную виноградную мезгу, опытные шампанские и коньячные виноматериалы, производственные образцы столовых и крепленых виноматериалов (необработанные). Анализ образцов на наличие в них молочнокислых бактерий показал, что МКБ в сброженной мезге были обнаружены в 5% проб, в опытных виноматериалах для производства игристых вин и коньяков – в 47% проб, в производственных виноматериалах – в 27% проб.

Из 206 проб с МКБ накопительные культуры были получены для 15 образцов сброженной мезги и 82 образцов виноматериалов, что указывает на высокую избирательность МКБ виноделия к составу среды. Молочнокислая микрофлора в отдельных накопительных культурах отличалась разнообразием, что позволило выделить 158 изолятов палочковидной формы и 294 изолята кокковой формы. Молочнокислые бактерии, развившиеся в сброженной мезге, представлены кокковыми и палочковидными формами, однако палочки преобладали. В производственных образцах виноматериалов также были обнаружены палочки и кокки. Молочнокислые бактерии, выделенные из виноматериалов, приготовленных в условиях микровиноделия, представлены только кокковыми формами. Изолированные чистые линии МКБ обладали разной способностью к накоплению биомассы, что еще раз подтверждает необходимость комплексного подхода к выбору условий культивирования для сохранения их в коллекции.

Оценка 108 изолятов на принадлежность их к молочнокислым бактериям показала, что все они каталазонегативны, положительно окрашивались по Граму и при сбраживании глюкозы образовывали молочную кислоту. Полученные результаты позволили отнести выделенные изоляты к группе молочнокислых бактерий.

МКБ кокковой формы в основном имели мелкие и средние клетки, расположенные единично, попарно и в цепочках по 4–12 клеток, реже – в длинных нитевидных цепочках с замедленным ростом. Встречались мелкие кокки, образующие пары и короткие цепочки по 4 клетки и небольшие скопления клеток. Изоляты палочковидной формы имели крупные, средние и мелкие клетки. В основном – короткие палочки, расположенные единично, попарно, в коротких и длинных цепочках и длинные нитевидные.

Морфология колоний представлена точечными и мелкими колонии, бесцветные, блестящие, круглые с ровным краем, выпуклые; консистенция – маслянистая. Больше разнообразие отмечено у палочек, выделенных из производственных виноматериалов.

Исследование характера сбраживания гексоз, определяющее принадлежность МКБ к той или иной биохимической группе, также является важной характеристикой для их классификации. В виноделии эта характеристика во многом определяет степень опасности, которую бактерии могут представлять для вина: наименее опасны те бактерии, которые в условиях низких значений pH сбраживают яблочную кислоту, не затрагивая сахаров, либо сбраживают сахара без образования летучих кислот. Наиболее желательными агентами ЯМБ являются гетероферментативные кокки и гомоферментативные палочки. В нашем исследовании 46 изолятов кокков в зависимости от накопления биомассы в большей или меньшей степени были способны к образованию углекислого газа из глюкозы. Два штамма не проявили эту способность, но на данном этапе исследований мы их не отнесли к роду *Pediococcus*, поскольку они не соответствовали данной группе по морфологическим признакам. Среди палочек гетероферментативных было большинство – 31 штамм, 11 изолятов по результатам теста отнесены нами к гомоферментативным.

Анализ полученных данных о морфолого-культуральных свойствах выделенных изолятов и их способности к сбраживанию глюкозы позволил на данном этапе исследований классифицировать их по родовой принадлежности. Сформированная рабочая коллекция МКБ представлена 88 штаммами МКБ:

– 42 штамма палочек отнесены к роду *Lactobacillus*, по морфологическим признакам разделены на 4 подгруппы, по характеру сбраживания глюкозы к двум биохимическим группам – гомо- и гетероферментативным.

– 46 изолятов кокков – к роду *Leuconostoc*, по морфологическим признакам разделены на 5 подгрупп, по характеру сбраживания глюкозы к одной биохимической группе – гетероферментативным.

В дальнейшем будет проведена видовая идентификация на основе секвенирования участка 16S рДНК у выделенных изолятов для определения их видовой принадлежности, что позволит расширить знания о МКБ виноградо-винодельческой отрасли Республики Крым и их влияние на качество получаемых виноматериалов.

Литература

1. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия / Н.И. Бурьян. – Симферополь: Таврида, 2003. – 560 с.
2. Методы техноконтроля в виноделии / под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида, 2002. – 260 с.
3. Бурьян Н.И., Тюрина Л.В. Микробиология виноделия. / Н.И. Бурьян, Л.В. Тюрина. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 272 с.
4. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 389 с.

Комплексное биотехнологическое использование лиственной целлюлозы с применением препаратов карбогидраз и *Bacillus coagulans*

Шевченко А.Р., Пучнина А.А., Аксенов А.С., Майорова К.А., Родичева М.А.

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск,
schewchenko.aleks@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38416

Переход к биоэкономике последних десятилетий обуславливается как стремлением к решению экологических вопросов, так и повышенным интересом к продуктам микробиологического синтеза и их производным. Безотходные технологии растительных ресурсов ориентированы на создание актуальных продуктов на всех этапах производства биовеществ [1].

Возможность комплексного биотехнологического использования древесной биомассы достигается современным уровнем развития методов предобработки. Эффективным промышленным способом удаления лигнина является сульфатная варка древесины различных пород. Из целлюлозы, полученной сульфатным способом можно достигнуть высокого выхода глюкозы и других сахаров при ферментативном гидролизе, что открывает новые возможности для микробиологического синтеза полезных соединений. Примером могут служить органические кислоты с высоким рыночным потенциалом, такие как молочная, гликолевая, фумаровая, янтарная и итаконовая, имеют наибольший научный и практический интерес [2, 3].

Стоит отметить, что в процессе ферментативной конверсии сульфатной целлюлозы одновременно с раствором сахаров образуется негидролизированный остаток, представляющий собой смесь полисахаридов с различной степенью биодеструкции. Данные продукты изучены недостаточно и в большинстве исследований рассматриваются как отходы. Одним из перспективных направлений является их химическая модификация, например в полисахаридные криогели, которые представляют собой сверхлегкие, пористые материалы, с различными изоляционными свойствами. Благодаря этим свойствам получаемые материалы находят новые применения в фармацевтической и различным техническим отраслям.

Цель данной работы – изучение возможности биотехнологического использования блененой сульфатной целлюлозы с получением двух продуктов: молочной кислоты и полисахаридных криогелей.

Техническая сульфатная блененая листовая целлюлоза (ОАО «Архангельский ЦБК») подвергалась ферментативной конверсии согласно методам, описанным в работе, с использованием ферментных препаратов рекомбинантного гриба *P. verruculosum* [4].

В качестве продуцента молочной кислоты использовался штамм *Bacillus coagulans* ВКПМ № В-10486. Лиофилизированную массу культуры методом истощающего штриха рассевали на чашку Петри с агаризованной питательной средой L, содержащей 5 г/л дрожжевого экстракта, 15 г/л пептона, 5 г/л NaCl. Дальнейшее культивирование продуцента проводили в лабораторном ферментере Biostat Aplus (Sartorius) на среде с гидролизатом ферментативной конверсии (6% глюкозы, 9% восстанавливающих сахаров древесной группы) при температуре 35 °С и перемешивании 180 об/мин в течение 52 ч. Анализ конечного продукта в культуральной жидкости осуществляли спектрофотометрическим методом [5].

Работа с нерастворимым продуктом гидролиза была направлена на получение криогелей путем растворения остатка в 85% фосфорной кислоте (H_3PO_4), дальнейшим высаждением и промывкой дистиллированной водой. Далее полученный гель замораживали и сушили сублимационно на Labconco FreeZone 2,5 [6].

Для изучения морфологии клеток продуцентов и криогелей использовали сканирующий электронный микроскоп SEM ZEISS Sigma VP (Oberkochen, Germany).

Степень конверсии блененой сульфатной листовой целлюлозы составила 70%. В гидролизате, который использовался как источник углерода в микробиологическом синтезе, большую часть сахаров составила глюкоза, а также продукты деструкции ксилана. Негидролизированный остаток, с выходом 30% после ферментативного гидролиза, был модифицирован химическим способом при получении полисахаридных криогелей.

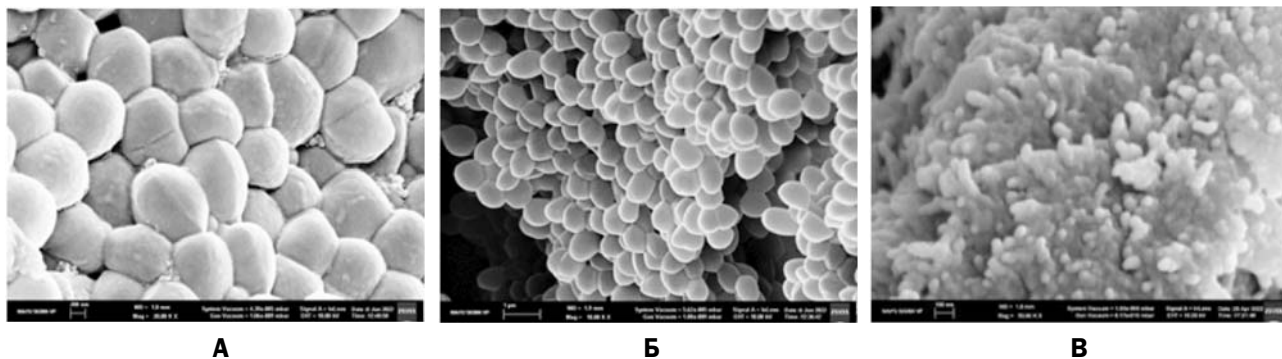


Рис. 1. SEM-изображения: А, Б – *Bacillus coagulans* ВКПМ № В-10486, В – криогель из негидролизованного остатка

Для микробиологического синтеза продуцента молочной кислоты использовали разбавленный гидролизат до уровня 2%. В результате культивирования концентрация клеток достигла 6,5 г/л, при этом количество сахаров снизилось в 10 раз, не только глюкозы, но и ксилозы. Концентрация молочной кислоты в культуральной жидкости составила 1 г/л. На SEM-изображениях (рис. 1а, 1б) представлены клетки штамма-продуцента палочки шарообразной формы, с размерами в среднем 0,9 мкм на 2 мкм, что значительно отличается от источников литературы.

Остаток после ферментативного гидролиза тщательно промывали от сахаров. Криогель получали в течение 24 часов при комнатной температура, выход составил 65%. Конечный продукт обладал характерной низкой плотностью около 0,06 г/см³ и высоким значением пористости – более 91%. Для подтверждения структуры были получены SEM-изображения (рис. 1в). Данный криогель обладал схожей структурой и свойствами с криогелями, полученными из товарной микрокристаллической целлюлозы [5].

Данная работа экспериментально показывает возможность комплексного использования сульфатной беленой целлюлозы для микробиологического синтеза и получения криогелей из остатка смеси полисахаридов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-20136).

Литература

1. Hurmekoski E. et al. (2020). Impact of structural changes in wood-using industries on net carbon emissions in Finland. *Journal of Industrial Ecology*, 24(4), pp. 899–912.
2. Novozhilov E.V. et al. (2016). Biocatalytic conversion of kraft pulp using cellulase complex of *Penicillium verruculosum*. *Catalysis in Industry*, 8(1), pp. 95–100.
3. Аблаев А.Р. и др. (2017). Химия биомассы: биотоплива и биопластики. 790 с.
4. Shevchenko A. et al. (2021). Products of hydrolysis of bleached hardwood kraft pulp by carbohydrate-active enzymes. In *The International Conference on Advances in Emerging Trends and Technologies* (pp. 114–123). Springer, Cham.
5. Борщевская Л.Н. и др. (2016) Спектрофотометрическое определение молочной кислоты. *Журнал аналитической химии*, 71(8), С. 787–790.
6. Tyshkunova I.V. et al. (2021). Cellulose cryogels prepared by regeneration from phosphoric acid solutions. *Cellulose*, 28(8), 4975–4989.

Перспективы использования биопрепаратов на основе цианобактериальных культур в сельском хозяйстве

Шишкина Е.В., Устюжанинова Л.В.

ФГБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров,
stud114566@vyatsu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38417

В наши дни остро стоит вопрос в экологизации земледелия, это подразумевает использование ресурсов почвы для сохранения ее плодородия, повышения урожайности различных сельскохозяйственных культур без использования препаратов, негативно влияющих на агроценоз [1, 2]. История применения биопрепаратов в сельском хозяйстве насчитывает более 100 лет. Тогда впервые для урожайности бобовых применили предпосевную обработку семян клубеньковыми бактериями. С течением времени спектр биопрепаратов на основе микроорганизмов расширился и продолжает расширяться. В последние годы исследования ученых направлены на создание биопрепаратов многофункционального действия, которые содержат не монокультуры, а поликомпонентные смеси микроорганизмов. Среди микробов-продуцентов, которые используют для создания биопрепаратов, особое место занимают цианобактерии. При условии качественных научных исследований в перспективе возможно создание биопрепарата много-

функционального действия на основе цианобактерий, который будет широко применяться в сельском хозяйстве [3].

При этом все большую актуальность приобретает использование биопрепаратов на основе цианобактерий. Эти микроорганизмы широко распространены в природе, их можно найти в водных и почвенных экотопах. Цианобактерии смогли занять различные среды обитания благодаря своим биохимическим и физиологическим особенностям, таким как способность к азотфиксации, фотосинтезу и широкому спектру адаптаций к условиям среды. Эти и другие особенности цианобактерий человек может использовать для решения некоторых проблем сельского хозяйства. Например, после использования биопрепаратов на основе цианобактериальных культур наблюдаются положительные эффекты: увеличивается содержание органических и минеральных форм азота в почве, происходит обогащение почвы фосфором, калием и значительным количеством микроэлементов; повышается водоудерживающая способность плодородного слоя до 50%; цианобактерии, которые находятся в составе биопрепарата, выделяют биологически активные вещества (например, витамины А, В, С, D, Е, фитогормоны, гормоноподобные вещества), которые повышают всхожесть, ускоряют рост растения и стимулируют жизнедеятельность многих полезных простейших организмов, а также обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам. Поэтому стоит исследовать, какие эффекты могут оказывать биопрепараты с данной экологической группой микроорганизмов в составе на сельскохозяйственные растения [1, 2]. В табл. 1 представлены таксоны цианобактерий, у которых были выявлены биологически активные вещества (БАВ): ауксины, цитокинины, гиббереллины, а также описано их влияние на растение [2].

Выявлен положительный эффект использования цианобактерий при выращивании овощных культур: активная колонизация ризопланы растений, изменение (рост) энергии прорастания и ростовых параметров по сравнению с необработанными растениями, также увеличение урожайности на 20–40% (в зависимости от вида культуры), улучшение физико-химических свойств почвы (повышение содержания N₂ в почве, изменение pH). При этом всем инокуляция культур сельскохозяйственных растений биопрепаратами с цианобактериями может сопровождаться фунгицидным действием, например, ингибированием развития фитопатогенных грибов (*Fusarium*, *Bipolaris*) [2].

Адаптационный потенциал цианобактерий к экстремальным условиям обеспечивается способностью продуцировать широкий спектр эндо- и экзометаболитов, благодаря которым они могут не только захватывать новые экотопы, но и вступать с другими микро- и макроорганизмами в симбиозы, позволяющие выживать и процветать в меняющейся среде. В процессе эволюции цианобактерии выработали механизмы детоксикации веществ, приводящих к гибели другие организмы. За годы исследований появились сведения о специфике среды обитания цианобактерий, консортивных связях, механизмах их адаптации, биохимических и физиологических возможностях. Цианобактерии являются фотоавтотрофами и поэтому не требуют сред с органическими компонентами и не нуждаются в связанных соединениях азота. Это отвечает одному из условий успешного биотехнологического производства – максимальная дешевизна питательных сред. Второе важнейшее требование микробной биотехнологии, которому отвечают цианобактерии, – высокие темпы размножения, что приводит к быстрому накоплению биомассы [3].

Цель нашего дальнейшего исследования – оценить биотехнологический потенциал цианобактерий, выделенных из различных источников.

Таблица 1

Биологически активные вещества цианобактерий [2]

Биологически активное вещество	Цианобактерии	Влияние на растение
Ауксины (преимущественно индолилуксусная и индолил-3-масляная кислоты)	<i>Anacystis nidulans</i> , <i>Phormidium foveolarum</i> , <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Tolypothrix tenuis</i> , <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Chlorogloea</i> sp. <i>Anabaena</i> sp., <i>Anabaenopsis</i> sp., <i>Calothrix</i> sp., <i>Chlorogloeopsis</i> sp., <i>Cylindrospermum</i> sp., <i>Glactothece</i> sp., <i>Plactonema</i> sp., <i>Synechocystis</i> sp.	Участвуют в контроле клеточного цикла, стимулируют образование боковых и придаточных корней, обуславливают взаимодействие отдельных органов, дифференцируют клетки, положительно влияют на биосинтетические процессы. Стимулирующее или ингибирующее действие на рост и развитие высших растений (кукуруза, овес, картофель, горох)

Биологически активное вещество	Цианобактерии	Влияние на растение
Цитокинины (к зеатин, зеатинрибозид, изопентениладенин)	<i>Anabaena</i> sp., <i>Chlorogloeopsis</i> sp., <i>Calothrix</i> sp.	Регулируют деление и линейный рост клетки, морфогенез побега и корня, созревание хлоропластов, образование добавочных почек и старение растения и т.д.
Гиббереллины	<i>Anabaenopsis</i> sp., <i>Cylindromum</i> sp.	Контролируют прорастание семян, рост стебля в длину, цветение и развитие органов цветка, расширение поверхности листа и т.д.

Литература

1. *Gonçalves A.L.* The Use of Microalgae and Cyanobacteria in the Improvement of Agricultural Practices: A Review on Their Biofertilising, Biostimulating and Biopesticide Roles // *Applied Sci-ences*. – 2021. – № 11(2). – P. 871.
2. Шарупова М.Ю., Егунова Е.Ю., Дубовик И.Е., Высоцкая Л.Б., Абдуллин Ш.Р. Биопрепараты на основе штаммов цианобактерий *Nostoc Punctiforme* и *Roholtiella* sp. // *Безопасность жизнедеятельности*. – 2019. – № 11. – С. 33–37.
3. Инновационное развитие агропромышленного комплекса как фактор конкурентоспособности: проблемы, тенденции, перспективы: Коллективная монография: в 2 ч. Ч. 1 / Л.М. Васильева [и др.]; под общ. ред. д-ра пед. наук Е.С. Симбирских. – Киров, 2020. – 414 с.

Скрининг коллекционных штаммов и природных изолятов *Fusarium* spp. и *Aspergillus flavus* с целью выявления наиболее активных продуцентов двух фузариотоксинов и афлатоксина В1

Щербакова Л.А.¹, Микиютк О.Д.¹, Назарова Т.А.¹, Зоров И.Н.^{1,2}

¹Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Большие Вяёмы, Московская область, larisavniif@yahoo.com

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, inzorov@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38418

Микотоксины, разнообразные по химической природе вторичные метаболиты микромицетов, относятся к наиболее опасным загрязнителям сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов. Ежегодно в мире выбраковывается около миллиона тонн продуктов сельского хозяйства из-за превышения допустимых концентраций токсинов *Fusarium* и *Aspergillus*. Поскольку эти грибы широко распространены в природе и способны вести сапротрофный образ жизни, практически невозможно полностью исключить вероятность контаминации ими растениеводческой продукции, как в процессе сбора урожая, так и при его хранении. Помимо физических и химических воздействий для деконтаминации загрязненных продуктов используют природные соединения, деградирующие микотоксины, например, ферменты растений или микроорганизмов. Для скрининга среди них наиболее перспективных агентов деконтаминации исследователи должны располагать штаммами, стабильно продуцирующими микотоксины в количествах, достаточных для их использования в качестве контрольных. Многочисленные анализы показывают, что многие фузариотоксины, в частности, зеараленон (ЗЕА) и дезоксиниваленол (ДОН), а также афлатоксин В1 (АФВ1) в различных концентрациях присутствуют в 60–80% проанализированных образцов фуражного зерна и других кормов [1–2]. Эти образцы могут служить доступным материалом для выделения соответствующих продуцентов. В то же время, известно, что далеко не все природные изоляты и

коллекционные штаммы *Fusarium* spp. и *Aspergillus* spp., у которых представлены полные кластеры генов биосинтеза токсинов и его регуляции, являются подходящими для использования в экспериментальной работе продуцентами фузарио- и афлатоксинов. Способность образовывать эти метаболиты реализуется не всегда и значительно варьирует у разных токсигенных штаммов, а также у одного и того же штамма, так как фенотипическое проявление данного признака сильно зависит от целого ряда факторов даже при культивировании грибов в контролируемых условиях [3]. Поэтому при проведении деконтаминационных исследований отбор продуцентов, стабильно образующих микотоксины в достаточно высоких количествах, представляет определенную проблему. Однако, широкое природное разнообразие фузариев и аспергиллов, паразитирующих на растениях или оккупирующих различные субстраты, открывает возможность ее решения. В связи с этим мы провели исследования по поиску и отбору наиболее активных продуцентов фузариотоксинов ЗЕА и ДОН, а также афлатоксина В1 (АФВ1) среди потенциально токсигенных природных изолятов и коллекционных штаммов *F. graminearum*, *F. culmorum* и *A. flavus* соответственно, поскольку указанные виды, как правило, являются основными продуцентами указанных микотоксинов.

Для первичного скрининга продуцентов АФВ1, ЗЕА и ДОН использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) в нескольких системах растворителей, которым анализировали экстракты мицелия грибов, после выделения их природных изолятов в чистую культуру или возобновления и проверки жизнеспособности коллекционных образцов. Синтезирующие целевые микотоксины изоляты и штаммы, отобранные по результатам ТСХ-анализа, поддерживали на КГА и хранили до пересевов при 4 °С. Кониции 14-суточных колоний использовали для инокуляции глубинных культур грибов на модифицированных средах Миро (*F. graminearum*, *F. culmorum*) или Пэйна-Хаглера (*A. flavus*), а также для заражения автоклавированного зерна пшеницы, кукурузы или риса. Токсигенный потенциал штаммов и изолятов оценивали, определяя количество их микотоксинов в культуральной жидкости (КЖ) или зараженном зерне с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Symmetry C18 (5 мкм, 150×4,6 мм), используя градиентную систему Waters 1525 Breeze, снабженную УФ-детектором Waters 2487 [4, 5]. ЗЕА и ДОН элюировали смесью ацетонитрил : метанол : вода (1:1:0.75 и 1:1:4 соответственно), АФВ1 – 50% водным метанолом и детектировали при 254 (ЗЕА, ДОН) или 362 нм (АФВ1). Концентрацию микотоксинов рассчитывали по калибровочной кривой в диапазоне линейного детектирования их коммерческих стандартов (Sigma-Aldrich Corp., США).

Способность продуцировать АФВ1 при 27 °С и φ = 95% была изучена у 33 выделенных с различных природных субстратов (зерно пшеницы, овса, риса, ячменя, кукурузы, семена рапса и подсолнечника; бобы сои, гороха и чечевицы; плоды арахиса и грецкого ореха) изолятов *Aspergillus* spp. У 27 из них по культурально-морфологическим признакам была подтверждена принадлежность к виду *A. flavus*. В свою очередь, 9 изолятов этого вида были способны продуцировать АФВ1, как при выращивании в глубинной культуре, так при твердофазном культивировании на автоклавированном зерне риса, пшеницы, кукурузы. Наиболее активным и стабильным продуцентом, секретирующим АФВ1 в КЖ и образующим его на зерновом субстрате, оказался изолят AF24, выделенный с арахиса (в среднем 35,6 мкг/г сухого мицелия, 232 мкг/кг зерна риса). Анализ 5 лиофилизированных образцов штаммов *A. flavus* из Всероссийской коллекции микроорганизмов показал, что 2 возобновленных штамма (AF11 и AF15) сохранили свою способность к синтезу АФВ1, причем AF11 *in vitro* продуцировал его значительно активнее (50 мкг/г), чем AF15 (0,12 мкг/г), в то время как штамм 2654 из Всероссийской коллекцией фитопатогенных микроорганизмов (ВКФМ) был нетоксигенен.

Способность к синтезу фузариотоксинов была протестирована у тех фитопатогенных *F. culmorum* (10 штаммов) и *F. graminearum* (15 штаммов), которые в каталоге ВКФМ значились как потенциально токсигенные. ВЭЖХ-анализ их КЖ показал, что в качестве активных продуцентов ЗЕА, стабильно образующих этот токсин *in vitro*, могут быть использованы штаммы *F. culmorum* F19 (53,0 мкг/г), OR-02-37 (до 91,3 мкг/г) и M-01-50/3 (20,9 мкг/г), а в случае ДОН – *F. culmorum* БР-03-21 (563 мкг/г) и *F. graminearum* FG-30 (278 мкг/г). Эти же штаммы оказались наиболее продуктивными из всех 25 исследованных при выращивании их на зерне пшеницы или кукурузы.

Таким образом, в результате тестирования 64 образцов трех видов токсигенных грибов выявлены наиболее активные продуценты АФВ1, ЗЕА и ДОН, стабильно образующие эти токсины в разных условиях. Все они сохраняли свою целевую активность на различных средах после многочисленных пересевов и хранения исходных культур, по крайней мере, в течение года. Данные продуценты могут быть

использованы для масштабного скрининга потенциальных агентов деконтаминации или ингибиторов токсигенеза, а также для оценки их эффективности.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ №22-16-00153).

Литература

1. Левитин М.М., Джавахия В.Г. Токсигенные грибы и проблемы продовольственной безопасности. Достижения науки и техники АПК, 2020, 34(12): 5–11.
2. El-Sayed R.A., Jebur A.B., Kang W., El-Demerdash K.W.F. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. Journal of Future Foods, 2022, 2(2): 91–102.
3. Awuchi C.G., Ondari E.N., Eseoghene I.J., et al. Fungal growth and mycotoxins production: types, toxicities, control strategies, and detoxification. In: Fungal Reproduction and Growth. 2021:100207. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251:10.5772/intechopen.100207.
4. Shcherbakova L.A., Statsyuk N.V., Mikityuk O.D., et al. Aflatoxin B1 degradation by metabolites of *Phoma glomerata* PG41 isolated from natural substrate colonized by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. Jundishapur J. Microbiol., 2015, 8(1): e24324.
5. Shcherbakova L.A., Nazarova T.A., Mikityuk O.D., et al. An extract purified from the mycelium of a tomato wilt-controlling strain of *Fusarium sambucinum* can protect wheat against fusarium and common root rots. Pathogens, 2018, 7(61): 1–20.

Биовыщелачивание арсенопиритного флотоконцентрата штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFBk

Ячкула А.А., Носков А.Е., Абашина Т.Н.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
repinaalenk@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38419

Автотрофные ацидофильные бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* являются классическими модельными микроорганизмами для изучения биовыщелачивания металлов из бедных сульфидных руд, отвалов и концентратов. Арсенопиритный флотоконцентрат содержит золото, никель, кобальт и другие ценные металлы, но он сложно поддается традиционным методам обработки, поэтому для него крайне важно разработать эффективные методы биовыщелачивания. Было установлено наличие генов устойчивости к мышьяку у *A. ferrooxidans* TFBk, что позволяет применять его для биовыщелачивания такого арсенопиритного сырья. Целью нашей работы было изучение ацидофильного автотрофного штамма *A. ferrooxidans* TFBk и возможности повышения его выщелачивающей активности. Известно, что биовыщелачивание арсенопирита может быть увеличено путем повышения окислительно-восстановительного потенциала за счёт дополнительной аэрации [1] или образования перекисей на введенном аноде [2]. В нашей работе было изучено влияние дополнительного окислителя персульфата на рост *A. ferrooxidans* TFBk и биовыщелачивание штаммом металлов из арсенопиритного флотоконцентрата.

Стимуляция биовыщелачивания персульфатом натрия

Исследованный флотоконцентрат содержал в качестве основных металлов: Fe – 24740, Cu – 953 и Ni – 150 мг/кг. Штамм *A. ferrooxidans* TFBk выращивали в среде 9К. В качестве сильного окислителя, отличного от пероксида водорода и представляющего собой более удобную для транспортировки и хранения форму, использовали персульфат натрия.

Результаты показали небольшое стимулирование роста биомассы в среде 9К без флотоконцентрата при концентрации персульфата 0,1% и подавление роста при более высоких концентрациях. Однако в присутствии выщелачиваемого сырья взаимодействие окислителя с концентратом снижало токсическое действие и повышало доступность минералов для бактерии. Результаты опытов по влиянию персульфатов на биовыщелачивание арсенопиритного сырья на среде 9К при инокуляции *A. ferrooxidans* TFBk представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние персульфата натрия на биовыщелачивание железа и сульфатов из арсенопиритного флотоконцентрата *A. ferrooxidans* TFBk в среде 9К

Время, сут	Персульфат натрия, 0.0%			Персульфат натрия, 0.3%			Персульфат натрия, 0.5%			Персульфат натрия, 1.0%		
	pH	Fe ³⁺ , mg/L	SO ₄ ²⁻ , mg/L	pH	Fe ³⁺ , mg/L	SO ₄ ²⁻ , mg/L	pH	Fe ³⁺ , mg/L	SO ₄ ²⁻ , mg/L	pH	Fe ³⁺ , mg/L	SO ₄ ²⁻ , mg/L
5	2.8	1300	520	3.3	1716	1280	3.3	2094	1500	2.9	2694	2118
10	2.7	1016	700	3.2	1855	1300	3.3	2284	1712	3.0	3315	2400
15	3.1	778	930	3.1	1890	1600	3.2	2300	1980	3.0	3350	2360

Скорость выщелачивания арсенопиритного сырья при добавлении персульфата была выше, чем в отсутствие дополнительного окислителя (табл. 1). В то же время методами микроскопии выявлены измененная морфология и уменьшение количества несорбированных клеток в суспензии при высоких концентрациях окислителя. В целом полученные результаты свидетельствуют об интенсификации химико-биологического выщелачивания минерального сырья персульфатом за счет взаимодействия окислителя с минералами.

Ранее нами было показано, что добавление персульфата или персульфата в сочетании с органическими кислотами может интенсифицировать химическое выщелачивание минералов [3]. В представленной работе показана возможность применения персульфата натрия для интенсификации биовыщелачивания арсенопиритного флотоконцентрата штаммом *A. ferrooxidans* TFBk.

Литература

1. Белый А.В., Малашинок А.П., Лескив М.В., Полицин Н.В. Способ биовыщелачивания упорных золотосодержащих сульфидных флотоконцентратов. Патент RU 2637204, опубл. 11.30.2017.
2. Секисов А.Г., Пискунов С.А., Филатов Б.Л. Способ выщелачивания золотосодержащих комплексных руд. Патент RU 2044875, опубл. 09.27.1995.
3. Abashina T.N., Yachkula A.A., Vainshtein M.B. Prevention of sulfuric acid pollution: intensification of metal leaching with organic acids. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2022, 981, 032029.

Научное издание

**VIII ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ»**

**Школа-конференция молодых ученых,
аспирантов и студентов**

**«Генетические технологии в микробиологии
и микробное разнообразие»**

6-8 декабря 2022 г.

Сборник материалов конференций

Подписано к печати 21.11.2022.
Формат 62×94/8. Печать офсетная.
Бумага офсетная, 80 г/м². Уч.-изд. 38 п.л. Тираж 70 экз.

ООО «Издательство ГЕОС»
125315, 1-й Амбулаторный пр., 7/3–114
Тел./факс: (495) 959-35-16, (499) 152-19-14, 8 926-222-30-91.
E-mail: geos-books@yandex.ru, www.geos-books.ru

Отпечатано с готового оригинал-макета в ОАО «Альянс «Югполиграфиздат»»
ООО «Т-Пресс» 400001, г. Волгоград, ул. КИМ, 6