

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание.....	3
Молекулярные механизмы образования и реактивации покоящихся форм микобактерий <i>Капрельянц А.С., Шлеева М.О., Салина Е.Г., Ажикина Т.Л.</i>	9
Биодеградация нефти и гены деградации <i>n</i> -алканов <i>alkB</i> и <i>ladA</i> термофильных бактерий родов <i>Aeribacillus</i> и <i>Geobacillus</i> , выделенных из нефтяных пластов <i>Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Ханина В.А., Шумкова Е.С., Машукова А.В., Назина Т.Н., Полтараус А.Б.</i>	10
Бинарные биоудобрения на основе ризобактерий <i>Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х.</i>	11
Регулирование формирования биопленок ризобиями в искусственной ассоциативной симбиотической системе огурца обыкновенного с ризобиями, синтезирующими экзополисахариды <i>Лавина А. М., Нигматуллина Л.Р., Сербаева Э.Р., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х.</i>	13
Выделение и характеристика бактериофагов специфичных для бактерий <i>Klebsiella pneumoniae</i> капсульного типа К-1 <i>Комисарова Е.В., Мякинина В.П., Красильникова В.М., Князева А.И., Вережкин В.В., Воложанцев Н.В.</i>	15
Использование атомно-силовой микроскопии и maldi масс-спектрометрии для сравнения <i>acinetobacter baumannii</i> в планктонной культуре и в биопленке <i>Детушева Е.В., Детушев К.В., Фурсова Н.К.</i>	16
Взаимодействие штаммов непатогенных иерсиний с факторами врожденного иммунитета человека <i>Киришева Н.А., Шайхутдинова Р.З., Титарева Г.М., Дентовская С.В.</i>	19
Изучение конкуренции медиатора электронного транспорта и кислорода в условиях микробного биотопливного элемента <i>Возчикова С.В., Алферов С.В.</i>	20
"Живые" гибриды на основе инкапсулированных в органосиликатную матрицу метилотрофных дрожжей <i>Ogataea polytricha</i> <i>Бурмистрова Т.В., Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Мачулин А.В.</i>	22
Определение показателя интегрального загрязнения воды на основе изменения метаболической активности дрожжевых клеток <i>Debaryomyces hansenii</i> ВКМ У -2482, защищенных органосиликатной оболочкой <i>Афоница Е.Л., Лаврова Д.Г., Каманина О.А., Пономарева О.Н.</i>	24
Выделение фермента алкогольоксидазы из клеток метилотрофных дрожжей <i>H.polytricha</i> NCYC 4951n <i>Зайцева Д.Ю., Зайцев М.Г.</i>	26

Влияние температуры на способность бактерий-эффективных нефтеструкторов <i>Rhodococcus</i> sp.S67 продуцировать гликолипидные биосурфактанты <i>Льонг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В.</i>	27
Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения Тульской области по отношению к ионам Pb(II) <i>Леонтьева М.М.</i>	29
БПК-биосенсор на основе дрожжей <i>Debaryomyces hansenii</i> , иммобилизованных в гель хитозана <i>Козлова Т.Н., Арляпов В.А.</i>	31
Биоэлектрокаталитическое окисление субстратов дрожжами <i>Debaryomyces hansenii</i> в присутствии бимедиаторной системы ферроцен-метиленовый синий как основа БПК-сенсора <i>Шишкарева Е.И., Зайцева А.С., Алферов В.А.</i>	33
Взаимодействие регулятора <i>LysR</i> -типа <i>SgpR</i> с промотором оперона деградации салицилата <i>sgpA1KGHB</i> <i>Филатова И.Ю., Музафаров Е.Н., Захарова М.В.</i>	35
Определение лимитирующей стадии реакции окисления органических субстратов бактериями <i>Gluconobacter Oxidans</i> , иммобилизованными в гидрогель модифицированного поливинилового спирта <i>Асулян Л.Д., Гавриков А.С., Камаева О.А.</i>	37
Биосенсоры для определения глюкозы на основе печатных электродов, модифицированных медиаторами и углеродными наноматериалами <i>Скворцова Л.С., Каманин С.С., Арляпов В.А.</i>	39
Регулирование активности аборигенных и инокулированных микроорганизмов-деструкторов с помощью сорбентов и мелиорантов в ходе биоремедиации нефтезагрязненных почв <i>Васильева Г.К., Стрижакова Е.Р., Кондрашина В.С., Зиннатшина Л.В., Слюсаревский А.В., Соколов А.П., Филонов А.Е.</i>	41
Роль токсин-антитоксиновых систем в персистообразовании <i>Mycobacterium smegmatis</i> в условиях действия тетрациклина <i>Замахаев М.В., Гончаренко А.В., Шумков М.С.</i>	43
Транскрипционный профиль гриба <i>Pseudogymnoascus rannorum</i> ВКМ F-3808 при действии стрессоров <i>Тарлачков С.В., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Стародумова И.П., Василенко О.В., Озерская С.М.</i>	45
Влияние слабых магнитных полей на <i>Rhodospirillum rubrum</i> 2R <i>Хохлова Г.В., Абашина Т.Н., Вайнштейн М.Б.</i>	48
Влияние pH на рост гриба <i>Mortierella alpina</i> NRRL-A-10995 и синтез арахидоновой кислоты <i>Степанова Н.Н., Миронов А.А., Камзолова С.В., Чистякова Т.И., Дедюхина Э.Г., Вайнштейн М.Б.</i>	50

II Пуццинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов"

Влияние природы лимитирующих рост компонентов на синтез арахидоновой кислоты <i>Mortierella alpina</i> Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Миронов А.А., Камзолова С.В., Вайнштейн М.Б.....	52
Стехиометрический синтез метаболитических путей Минкевич И.Г.....	54
Новые экстремофильные бактерии, восстанавливающие железо и нитраты в низкотемпературных экосистемах Захарюк А.Г., Дамбинова Е.Ц.....	55
<i>Sphaerochaeta associata</i> sp. nov., новый вид кокковидных спирохет и распространение бактерий рода <i>Sphaerochaeta</i> Трошина О.Ю., Ошуркова В.И., Сузина Н.Е., Мачулин А.В., Арискина Е.В., Винокурова Н.Г., Щербакова В.А.....	56
Разнообразие и таксономия психрофильных протеолитических бактерий из холодных источников Северного Прибайкалья Чувильская Н.А., Дамбинова Е.Ц., Рыжманова Я.В., Лауринавичюс К.С., Щербакова В.А. ¹	58
Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации метаногенных архей: возможности и ограничения Ошуркова В.И., Лауринавичюс К.С., Щербакова В.А.....	59
Новые анаэробные бактерии, выделенные из криопэгов и содовых озер Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.....	60
Функционирование Pma1 H ⁺ -АТФазы дрожжей при изменении заряда: роль остатков Asp-739 и Arg-811 Петров В.В.....	61
Влияние мутаций в регуляторном домене H ⁺ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> на метаболизм полифосфатов Томашевский А.А., Петров В.В.....	63
Устойчивость дрожжей к ионам марганца: характеристики роста и клеточная морфология Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Дмитриев В.В., Кулаковская Т.В.....	64
Рекомбинантная полифосфатаза РРХ1 для анализа полифосфатов Личко Л.П., Кулаковская Т.В.....	66
Полифосфаты и полифосфатазная активность дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при сверхэкспрессии гена DDP1 Трилисенко Л.В., Андреева Н.А., Кулаковская Т.В.....	68
Трёхмерная модель метакрилатной редокс системы <i>Geobacter sulfurreducens</i> Архипова О.В., Трошина О.Ю., Микулинская Г.В.....	70

Синтез L-лактатоксидазы дрожжами <i>Yarrowia lipolytica</i> в условиях погруженного культивирования (в биореакторах) <i>Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i>	73
Низкомолекулярный антимикробный пептид из <i>Trichoderma cf. aureoviride</i> Rifai ВКМФ-4268D <i>Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i>	75
Новые штаммы дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> - продуценты α -кетоглутаровой кислоты <i>Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Пунтус И.Ф., Самойленко В.А., Моргунов И.Г.</i>	77
Сравнительная характеристика диоксигеназ расщепления ароматического кольца из <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP и <i>Rhodococcus wratislawiensis</i> G10 при росте на бензоате натрия <i>Соляникова И.П., Борзова О.В., Шумкова Е.С., Головлёва Л.А.</i>	78
Ацетилирование гербицида глифосата - новый способ его деструкции почвенными бактериями <i>Achromobacter</i> sp. Кг 16 <i>Шушкова Т.В., Винокурова Н.Г., Зеленкова Н.Ф., Баскунов Б.П., Свиридов А.В., Ермакова И.Т., Леонтьевский А.А.</i>	81
Двухдоменные лакказы из бактерий рода <i>Streptomyces</i> : исследование структуры и свойств ферментов <i>Трубицина Л.И., Лисов А.В., Захарова М.В., Леонтьевский А.А.</i>	83
Биосинтез такролимуса актинобактериями рода <i>Streptomyces</i> и селекция высокоактивного штамма-продуцента <i>Пошехонцева В.Ю., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	85
Биотрансформация модифицированных стероидов – основа нового способа получения дегидроэпиандростерона <i>Довбня Д.В., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	87
Полногеномный биоинформатический анализ генов стероидного катаболизма штамма <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д <i>Штратникова В.Ю., Щелкунов М.И., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Донова М.В.</i> ...	89
Трансформация прегненолона в 11 α -гидроксипрогестерон мицелиальными грибами <i>Коллеров В.В., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	92
Метаболическая гибкость <i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z открывает новые биотехнологические перспективы метанотрофов <i>Бут С.Ю., Калюжная М.Г.</i>	94
Потенциальные функции ХохF в биодеградациии дихлорметана у аэробных метиловых бактерий <i>Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Троценко Ю.А.</i>	96

Колонизация метиловобактериями повышает антиоксидантную защиту растений в условиях окислительного стресса <i>Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.</i>	98
Полигидроксибутират-синтазы представителей рода <i>Methylobacterium</i> : молекулярные аспекты <i>Замахаева С.А., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.</i>	99
Роль глюкокиназ в метаболизме облигатных метанотрофов <i>Солнцева Н.П., Мустахимов И.И., Розова О.Н., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А.</i>	101
Биосинтез полигидроксибутирата метиловобактериями <i>Methylobacterium extorquens</i> G10 и <i>Methyloligella halotolerans</i> C2 <i>Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А.</i>	103
Свойства и роль фосфотрансацетилазы в метаболизме <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> 20Z <i>Бочарова К.А., Розова О.Н., Бут С.Ю., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А.</i>	105
Эпифитные микроорганизмы-деструкторы ПАУ филлосферы городских древесных растений <i>Сазонова О.И., Соколов С.Л., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А.</i>	107
Бактерии рода <i>Rhodococcus</i> , утилизирующие парафины в широком температурном диапазоне <i>Фунтикова Т. В., Пунтус И. Ф., Гафаров А. Б., Филонов А. Е.</i>	109
Мониторинг загрязненных нефтью почв Приаральского региона <i>Пунтус И. Ф., Ахметов Л. И., Фунтикова Т. В., Филонов А. Е.</i>	111
Гемолизин II, контролируемый HlyIII, атакует эукариотические клетки и ткани <i>Ковалевская Ж.И., Бударина Ж.И., Нагель А.С., Холодков О.А., Солонин А.С.</i>	113
Глобальный регулятор Fug и окислительный стресс <i>Салямков В.И., Солонин А.С.</i>	114
Белок p7 бактериофага Xp10 <i>Шадрин А., Mekler V., Sheppard C.M., Wigneshwe-raraj S.R., Северинов К.В., Солонин А.С.</i>	115
Термостабильная пептидогликангидролаза бактериофага T5: бактериолитическое действие in vitro <i>Шаврина М.С., Зимин А.А., Микулинская Г.В.</i>	117
Подходы к применению нетрансдуцирующих бактериофагов для профилактики и терапии кишечного эшерихиоза свиней <i>Скобликов Н.Э., Зимин А.А.</i>	119
Изучение динамики титра колифагов при формировании и развитии кишечного микробиоценоза порослят на фоне приема экспериментального фагового препарата <i>Скобликов Н.Э., Забашта Н.Н., Москаленко Е.А., Зимин А.А.</i>	122

Каталог белков Нос бактериофагов подсемейства <i>Teequatrovirinae</i> Зимин А.А., Микулинская Г.В., Назипова Н.Н.....	124
Исследование экспрессии гена 1 бактериофага Т4 под контролем промотора гена 10 бактериофага Т7 в биплазмидной системе при температуре 37 - 50°C Зимин А.А., Феофанов С.А., Васильева Е.Л.....	127
РНК-лигаза 2 бактериофага Т4: исследование активности гомогенного фермента при использовании в качестве субстрата ДНК-олигонуклеотидов Зимин А.А., Савельева Н.В., Шляпников М.Г., Ванькова О.Е.....	129
Сравнительная геномика Т4-подобных бактериофагов (<i>Myoviridae, Caudovirales</i>), выделенных из желудочно-кишечного тракта свиней Зимин А.А., Кудрявцева А.В., Василенко О.В., Салямков В.И., Летаров А.В., Летарова М.А., Куликов Е.Е., Скобликов Н.Э.....	132
Масс-спектрометрическое изучение биодegradации и трансформации фенантрена плазмидосодержащими ризосферными бактериями <i>Pseudomonas aureofaciens</i> Зякун А.М., Кочетков В.В., Захарченко В.Н., Баскунов Б.П., Пешенко В.П., Лауринавичюс К.С., Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Боронин А.М.....	134
Использование сайт-специфичного распределения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ изотопов в дикарбоновых гидроксикислотах как показатель их биогенного и абиогенного происхождения Зякун А.М., Захарченко В.Н., Баскунов Б.П., Пешенко В.П.....	135
Биологически активные соединения грибов секции <i>Usti</i> рода <i>Aspergillus</i> Козловский А.Г., Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Озерская С.М.....	136
Конвертерное накопление напряжения от биотопливного элемента на основе клеток <i>Glucanobacter oxydans</i> Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Китова А.Е., Ивахненко А.А., Решетилов А.Н.....	138
Безмедиаторное биоэлектродокаталитическое окисление этилового спирта на электроде из терморасширенного графита, модифицированного клетками <i>Glucanobacter oxydans</i> и их мембранными фракциями Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетилов А.Н.....	140
Сравнение характеристик биоанодов в биотопливном элементе при модификации их углеродными наноматериалами Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Китова А.Е., Решетилов А.Н.....	142
Структурно-функциональные перестройки плазмалеммы дрожжей Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Колесникова С.А., Дмитриев В.В.....	144

Молекулярные механизмы образования и реактивации покоящихся форм микобактерий

Капрельянц А.С.¹, Шлеева М.О.¹, Салина Е.Г.¹, Ажикина Т.Л.²

¹ ФИЦ биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, г. Москва

² Институт биоорганической химии РАН, г. Москва

Бактерии в результате эволюции приобрели существенный арсенал разнообразных механизмов, используемых для адаптации к стрессовым факторам окружающей среды. В предельном случае ограниченная группа бактерии способна к спорообразованию, в качестве универсального механизма защиты. У микобактерий аналогом спорообразования является формирование покоящихся форм (ПФ), позволяющих переживать стрессовые ситуации. В частности, *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) в виде покоящихся форм могут персистировать в организме человека и животных значительное время, вызывая латентный туберкулез - длительный асимптоматический инфекционный процесс.

Для исследования ПФ МТБ были созданы экспериментальные модели *in vitro*, имитирующие стрессовые факторы в теле хозяина, которые позволили получать ПФ в препаративных количествах для дальнейших исследований. Такие «искусственные» ПФ микобактерий претерпевали морфологические изменения и характеризовались частичной или полной некультивируемостью (неспособность давать колонии на твердых средах), а также существенно сниженным уровнем метаболической активности, устойчивостью к воздействию высоких температур и антибиотиков.

Согласно транскриптомному анализу микобактерии содержат целый ряд генов и генных кластеров, экспрессия которых сопровождает переход клеток в покоящееся состояние. Анализ результатов этих исследований позволил сформулировать несколько гипотез о перестройках в метаболических путях бактерий в процессе их физиологической трансформации. Методом полномасштабного секвенирования обнаружена глобальная репрессия транскрипции белок-кодирующих генов в покоящихся «некультивируемых» клетках МТБ, что, по-видимому, является стратегией поддержания покоящегося состояния путем снижения метаболической активности клеток. В тоже время, ПФ содержат пул стабильных мРНК, кодирующих синтез белков, вовлеченные в процессы адаптации и репарации, детоксикации, контроля и инициации транскрипции, а также транскрипты некодирующих малых РНК MTS0997, MTS1338, MTS2823. Предполагается, что малые РНК принимают участие в адаптации МТБ к стрессовым условиям *in vitro* и *in vivo*, а «запасенные» кодирующие транскрипты используются патогеном на стадии реактивации.

Протеомный анализ выявил существенную модификацию набора белков в ПФ *M.smegmatis* по сравнению с активными клетками, в том числе пул белков с повышенной представленностью в протеоме ПФ. Среди них обнаружен доминантный мембранный белок - RadR, образующий комплекс с клеточной РНК. Биохимический анализ ПФ микобактерий выявил доминирующее содержание среди низкомолекулярных веществ (более 50%) свободной трегалозы – известного фактора стрессорной защиты прокариот.

При исследовании путей реактивации покоящихся микобактерий установлено, что факторами инициации этого процесса могут быть свободные ненасыщенные жирные кислоты, которые, активируя внутриклеточную аденилатциклазу (MSMEG_4279), приводят к повышению уровня цАМФ, что сопровождается появлением мембранного

потенциала клетки и активации синтетических процессов. На этом этапе реактивации происходит распад трегалозы и повышение уровня глюкозы, которая, возможно, используется в качестве источника энергии на раннем этапе в гликолитическом пути. На более поздних этапах реактивации включаются белки семейства Rpf, являющиеся ферментами пептидогликангидролазами (литическими трансгликозилазами), принимающими участие в перестройке клеточной стенки бактерий, предшествующей запуску деления клеток.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 13-04-40071Н, 15-04-05286а, 14-04-01608а и 15-04-04563а.

Биодеградация нефти и гены деградации *n*-алканов *alkB* и *ladA* термофильных бактерий родов *Aeribacillus* и *Geobacillus*, выделенных из нефтяных пластов

Турова Т.П.¹, Соколова Д.Ш.¹, Ханина В.А.³, Шумкова Е.С.², Машукова А.В.¹, Назина Т.Н.¹, Полтараус А.Б.³

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Имеющиеся в настоящее время сведения о генах биодеградации *n*-алканов были получены в основном на мезофильных микроорганизмах [1]. У мезофильных бактерий, деструкторов *n*-алканов, наиболее распространенной является трехкомпонентная ферментная система, алкан-гидроксилаза, ключевым ферментом которой является алкан-монооксигеназа (*AlkB*). Процесс биодеградации нефти термофильными прокариотами и гены, ответственные за этот процесс, остаются мало изученными.

Термофильные бактерии рода *Geobacillus* являются обычными обитателями нефтяных пластов, они способны потреблять нефть, индивидуальные *n*-алканы и ароматические углеводороды. Впервые показано, что у геобацилл встречается 8 вариантов гена *alkB* (*alkB-geo1*, *alkB-geo2*, *alkB-geo3*, *alkB-geo4*, *alkB-geo5*, *alkB-geo6*, *alkB-geo7* и *alkB-geo8*) [2]. У отдельных штаммов геобацилл выявлено от трех до семи гомологов генов алкан-монооксигеназы (*alkB*), из которых только два являются универсальными для всех штаммов [2, 3]. Показан высокий уровень сходства отдельных гомологов *alkB* генов бактерий родов *Geobacillus* и *Rhodococcus*. В последние годы нами был выделен ряд штаммов термофильных спорообразующих бактерий родов *Geobacillus* и *Aeribacillus* из нефтяных пластов.

Целью настоящей работы было изучение биодеградации *n*-алканов нефти термофильными бациллами родов *Geobacillus* и *Aeribacillus* и детекция генов, кодирующих алкангидроксилазы *AlkB*, *LadA* и алкангидроксилазу семейства бактериальных цитохромов *P₄₅₀ CYP153*.

В работе исследовали штаммы В-1024, 1017 и 8m3 принадлежащие к видам *Geobacillus toebii*, *Geobacillus stearothermophilus* и *Aeribacillus pallidus* соответственно.

Деградация *n*-алканов нефти термофильными бациллами. Исследована деградация фракции *n*-алканов при росте на сырой нефти выделенных штаммов. Штамм *G. toebii* В-1024 использовал наиболее широкий спектр *n*-алканов нефти, включая C₁₀-C₃₀

n-алканы, *G. stearothermophilus* 1017 использовал C_{10,11} и C₁₃ – C_{19,22} *n*-алканы, а *A. pallidus* 8m3 деградировал средне- и длинноцепочечные C₁₁ – C₂₉ *n*-алканы.

Детекция генов *alkB*, *ladA* и *CYP P₄₅₀* у термофильных бацилл. С использованием ДНК, выделенной из биомассы 3-х исследованных штаммов, были поставлены ПЦР с праймерами к генам *ladA*, *ladB*, *CYP* и *alkB*. Наличие ПЦР-продукта определяли электрофоретически. Необходимая длина ПЦР продукта для *ladA* гена составляла около 1500 п.н., для *ladAα* и *ladAβ* – около 1500 п.н., *ladB* – около 1000 п.н., для *P₄₅₀ cyp153* гена – 800 п.н. и 500 п.н. для *alkB* гена.

В результате ПЦР с использованием праймеров, специфичных гену *alkB*, ПЦР-продукт ожидаемой длины (около 500 п.н.) был получен для всех исследованных штаммов – *A. pallidus* 8m3, *G. stearothermophilus* 1017 и *G. toebii* 1024. С праймерами к гену *ladAα* специфичный ПЦР-продукт (около 1500 п.н.) был получен только для *A. pallidus* 8m3. С праймерами к гену цитохром подобной монооксигеназы (*CYP153A*) специфичной амплификации не наблюдалось для всех исследуемых штаммов термофильных бацилл.

Полученные ПЦР продукты были секвенированы и проанализированы при помощи алгоритма BLAST. Гены *alkB* у всех штаммов имели 100% сходства с геном *alkB-geo1* штамма *G. stearothermophilus* DSM 22^T (EF534128.1). Отметим, что ранее ген *alkB-geo1* был выявлен у 11-ти штаммов углеводородокисляющих геобацилл [2]. Эти нуклеотидные последовательности имели также 99% сходства с геном *alkB4* грамположительных коринебактерий *Nocardia* sp. H17-1 (AY625606.1) и *Rhodococcus* sp. Q15 (AF388180.1). Ген *ladA* (кодирующий алкан-монооксигеназу, осуществляющую окисление длинноцепочечных алканов), обнаруженный у *A. pallidus* 8m3, имел 100% сходства с геном *ladAα*, кодирующим монооксигеназу *LadAα* у *G. thermoleovorans* B23 (AB727923.1). Таким образом, впервые у представителя рода *Aeribacillus* (*A. pallidus* 8m3) найдены гены *alkB-geo1* и *ladA*, кодирующие алкан-монооксигеназы, окисляющие *n*-алканы со средней длиной углеводородной цепи и длинноцепочечные *n*-алканы, соответственно.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-02622).

Список литературы:

1. van Beilen J.B., Smits T.H.M., Roos F.F., Brunner T., Balada S.B., Röthlisberger M., and Witholt B. Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases // J. Bacteriol. 2005. V. 187(1). P. 85-91.
2. Турова Т.П., Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Родионова Т.А., Екимов А.Н., Машукова А.В., Полтараус А.Б. Гомологи *alkB* гена термофильных бактерий рода *Geobacillus* // Молекулярная биология. 2008. № 2. С. 247-257.
3. Коршунова А.В., Турова Т.П., Шестакова Н.М., Михайлова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция и транскрипция генов биодegradации *n*-алканов (*alkB*) в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* штамм К // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 669-678.

Бинарные биоудобрения на основе ризобактерий

Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х.

Лаборатория молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Приоритетным направлением экологического земледелия является использование всего потенциала растительно-микробных взаимоотношений, благодаря которым

возможны увеличение качества и количества урожая. Следовательно, закономерным является повышение интереса к микробным препаратам, выделенным из естественных биоценозов, которые не загрязняют окружающую среду и безопасны для человека и животных. Такие препараты, содержащие живые микроорганизмы, способствуют улучшению питания растений, регуляции роста и развития, а также защиты от фитопатогенов. Одним из наиболее эффективных способов улучшения экологического земледелия является обработка растений симбиотическими для них видами микроорганизмов, при этом наибольшую эффективность показывает совместная обработка (двойная инокуляция) растений несколькими видами или штаммами микроорганизмов, так как такие сочетания более стабильны и устойчивы к неблагоприятным условиям окружающей среды.

К хозяйственно-полезным видам бактерий относятся микроорганизмы рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии или ризобии). Они играют огромную роль в бобово-ризобиальном симбиозе, являясь самыми эффективными азотфиксаторами и обеспечивая растения минеральным азотом, фиксированным из атмосферы. Прикрепление ризобий к корневым волоскам растений является очень ранним и определяющим этапом в формировании взаимодействия бактерии-растение. Чтобы облегчить этот этап при производстве биопрепаратов ризобактерий добавляют патоку, гумат натрия, желатин и другие вещества. В качестве альтернативы можно использовать природные молекулы-посредники прикрепления бактериальных клеток к поверхности корневых волосков. Одним из них является белок-адгезин RapA1, который был нами исследован и показал свою эффективность в качестве посредника для прикрепления ризобактерий к поверхности корней растений. Белок RapA1 имеет сходство с рикадгезинами, которые связывают Ca^{2+} и участвуют в адсорбции бактерий к поверхности корневых волосков растений, но, тем не менее, отличается некоторыми биохимическими свойствами и размерами, кроме того встречается только у небольшой группы ризобий.

Целью данной работы являлось исследование возможности использования бактериального адгезина RapA1 *Rhizobium leguminosarum* в качестве инструмента для создания искусственных симбиотических систем культурных растений с PGPR микроорганизмами.

Объектами исследования в данной работе служили растения фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) сорта Эврика, козлятника восточного (*Galega orientalis*). В экспериментах был использован ген *rapA1* *R. leguminosarum*, зарегистрированный под номером AF265223 в GenBank. При проведении экспериментов по клонированию применяли штамм *E. coli* XL1-Blue и плазмиды pJN105, pTurboGFP-B.

Для получения экспрессирующей в бактериях векторной конструкции был амплифицирован ген *rapA1*, затем клонирован в вектор pJN105TurboGFP, вместо вырезанного гена *GFP*. Так была получена векторная конструкция pJN105TurboRapA1 для трансформации *R. leguminosarum* PVu5 и *R. galegae* 0702. Таким образом, были получены штаммы ризобактерий, секретирующие белок RapA1, что было подтверждено иммуноблоттом.

Для проверки действия двойной инокуляции были поставлены опыты с различными сочетаниями штаммов бактерий. Был использован штамм-продуцент белка RapA1 в различных сочетаниях с другими бактериями. В данном случае адгезин RapA1 выступал в качестве посредника в прикреплении ризобактерий к корневым волоскам растений. Опыты были поставлены на растениях фасоли с симбиотрофными для него ризобиями *R. leguminosarum* (штамм PVu5) и козлятника с *R. galegae* 0702. Измерялись

количество клубеньков, ростовые параметры, сырая и сухая биомасса растений и нитрогеназная активность.

Полученные результаты показывают, что моноинокуляция растений фасоли и козлятника симбиотрофными для них штаммами ризобактерий (PVu5 и *R. galegae* 0702, соответственно) оказывают положительное влияние на образование клубеньков и ростовые параметры. Однако результаты, полученные при обработке растений штаммами, которые сами продуцировали белок RapA1 или он секретировался в сокультивируемом штамме-продуценте белка, оказались более показательными. Например, обработка фасоли PVu5 с PVu5+RapA1, PVu5+RapA1 с *R. galegae* 0702+RapA1, PVu5+RapA1 с *R. galegae* 0702 и только PVu5+RapA1 увеличила количество клубеньков в среднем вдвое в отличие от растений, обработанных только PVu5. Данная закономерность сохраняется и на длину растений, биомассу и нитрогеназную активность. В опытах на козлятнике результаты были схожи: при обработке штаммами, вырабатывающими белок RapA1, показатели были в 2,1-2,5 раза выше, чем при обработке только *R. galegae* 0702.

Применение на практике биологических и комбинированных препаратов на основе ризобактерий, является одним из главных направлений в сельском хозяйстве для получения экологически чистой продукции безопасной для человека. Таким образом, перспективными являются работы, посвященные поиску и получению бинарных удобрений на основе ризобактерий для применения в сельском хозяйстве.

Работа выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН и при финансовой поддержке гранта РФФИ-Поволжье № 14-04-97005, программы поддержки ведущих научных школ № НШ-5923.2014.4.

**Регулирование формирования биопленок ризобиями в
искусственной ассоциативной симбиотической системе огурца
обыкновенного
с ризобиями, синтезирующими экзополисахариды**

**Лавина А.М.¹, Низматуллина Л.Р.¹, Сербеева Э.Р.²,
Вершинина З.Р.¹, Баймиев Ал.Х.¹**

¹ Лаборатория молекулярной биологии и нанобиотехнологии ФГБУН Института биохимии и генетики УНЦ РАН, г.Уфа

² ФГБУ Башкирский государственный университет, г.Уфа

Создание искусственных симбиотических ассоциаций культурных растений с ризосферными микроорганизмами, которые выделены из природных симбиозов, является новым перспективным направлением в биоинженерии симбиотических систем. Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium* фиксирующие азот в симбиозе с бобовыми растениями, могут выступать в качестве полезных ассоциативных микросимбионтов для такой экономически ценной небобовой культуры как огурец обыкновенный. Однако ассоциативные процессы сложно контролируемы, и в естественных условиях ризосферные бактерии с полезными признаками не выдерживают конкуренции и вытесняются более агрессивными бактериями, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами. Решением данной проблемы является регулирование формирования

биопленок ризобиями в ассоциативных симбиотических системах, так как формирование биопленок позволяет неспорообразующим бактериям почвы колонизировать окружающую среду обитания, и, дает возможность выжить в условиях экологического стресса. Именно оно имеет решающее значение для выживания ризобактерий, а также для установления симбиотических отношений с растениями.

Прикрепление ризобий к поверхности корней растений – это первоначальный этап в процессе заражения растения и формирования биопленок ризобиями. Этот процесс опосредуют различные механизмы и различные поверхностные молекулы как ризобий, так и растения-хозяина. Наиболее важными среди них являются бактериальные поверхностные полисахариды, а именно экзополисахариды (EPS). Накопленные данные свидетельствуют о том, что экзополисахариды вовлечены в инфицирование и образование клубеньков, в процесс бактериального освобождения от инфекционных нитей, развития бактериоидов, подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений. Кроме того согласно результатам, полученным при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных небобовых растений, инокуляция растений штаммами ризобий, синтезирующими экзополисахариды значительно увеличивает всхожесть семян и рост проростков небобовых растений в ассоциативном симбиозе. В виду этого целью данной работы являлось регулирование формирования биопленок ризобиями в искусственной ассоциативной симбиотической системе огурца обыкновенного с ризобиями, синтезирующими экзополисахариды.

Для данного исследования нами были выбраны следующие гены: *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, так как данные гены хорошо изучены, участвуют в синтезе экзополисахаридов и процессах сигналинга, а также формировании клубеньков. Для определения наличия у исследуемых штаммов ризобий генов экзополисахаридов нами был проведен скрининг 34 штаммов *R. leguminosarum*. В результате скрининга были выявлены 4 штамма ризобий, содержащие все исследуемые гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов и 1 штамм ризобий, у которого были идентифицированы 4 из 5 генов.

С целью анализа влияния ризобий, представленных в виде биопленок, на семена растений, нами была проведена оценка ростостимулирующего эффекта 2 штаммов *Pseudomonas aureofaciens*, 1 штамма *R. galegae* и 7 штаммов *R. leguminosarum*, у 5 из которых были идентифицированы гены, ответственные за синтез экзополисахаридов. Для того чтобы избежать негативного воздействия на исследуемые растения, были проведены опыты по инокуляции растений различными концентрациями ризобий. Таким образом, были выявлена оптимальная концентрация, при которой штаммы обладают ростостимулирующим эффектом, не оказывая негативного влияния на растения огурца – 10^4 КОЕ/мл. Далее семена инокулировали суспензией данных штаммов. Через неделю подсчитывали процент всхожести семян и длину корней и гипокотилей.

Было выявлено, что инокуляция растений штаммами ризобий увеличивает всхожесть семян огурца (от 13% до 27% выше показателя контрольных растений). Это явление может быть связано с синтезом ризобиями экзополисахаридов и фитогормонов согласно результатам, полученным зарубежными авторами при исследовании влияния штаммов ризобий на всхожесть семян различных небобовых растений. Нами было показано положительное влияние ризобий на рост проростков огурца. При анализе влияния биопленок, образованных на поверхности корней растений, мы отметили увеличение длины корней проростков (от 12 до 45%). Значения длин гипокотилей проростков, инокулированных ризобиями, синтезирующими экзополисахариды, также были значительно больше по сравнению с контролем. Опытные проростки были длиннее

контрольных на 27%-36%, в зависимости от того каким штаммом было обработано растение. В многочисленных работах по изучению, влияния ризобий на увеличение длины проростков различных растений, было доказано, что ризобии выделяют ростостимулирующие гормоны (индол-3-уксусную кислоту, цитокинины и гиббереллины), а синтез ими экзополисахаридов, способствует прикреплению ризобий к поверхности корней и их выживанию. Это подтверждает возможность регулирования формирования биопленок ризобиями в искусственной ассоциативной симбиотической системе огурца обыкновенного с ризобиями, синтезирующими экзополисахариды и их ростостимулирующий эффект на семена данного растения.

Выделение и характеристика бактериофагов специфичных для бактерий *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа К-1

***Комисарова Е.В., Мякина В.П., Красильникова В.М.,
Князева А.И., Вережкин В.В., Воложанцев Н.В.***

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск

Klebsiella pneumoniae является важным патогеном человека, преимущественно, в госпитальной среде. Чаще всего бактерии этого вида вызывают нозокомиальные инфекции, такие как сепсис, пневмония, инфекции урогенитального тракта, хирургические и катетер-ассоциированные инфекции. Но, с середины 1980 г. г., в странах Азиатско-Тихоокеанского региона (Тайвань, Вьетнам, Япония, Китай, Корея) начали появляться новые гипервирулентные варианты *K. pneumoniae* (hvKP), вызывающие внебольничные инфекции, наиболее частым проявлением которых являются гнойные абсцессы печени. В настоящее время отдельные случаи выделения hvKp-штаммов от больных людей зарегистрированы в Соединенных Штатах, Канаде, Таиланде, Австралии, Дании, Израиле, Бразилии, Румынии, Франции и некоторых других странах.

Характерным признаком большинства штаммов hvKp является гипермукоидность, связанная, как полагают, с повышенным количеством капсульного материала, не отличающегося по составу от поверхностных полисахаридов (КПС) обычных штаммов *K. pneumoniae*. Обусловленная одним из генов вирулентности hvKP-штаммов (геном *trpA*) избыточная продукция КПС обеспечивает защиту этих штаммов от фагоцитоза и антимикробных пептидов.

Капсула является основным фактором вирулентности *K. pneumoniae*, а капсульный серотип напрямую связан с тяжестью протекающей инфекции. Отмечено, что при гнойных абсцессах печени чаще всего выделяются hvKP-штаммы серотипа К-1.

Сдерживающим фактором распространения hvKp-бактерий могут являться бактериофаги, продуцирующие специфические ферменты - деполимеразы. Эти ферменты способны разрушить капсульные полисахариды, обеспечивая тем самым последующую адсорбцию фага на рецепторах наружной мембраны и проникновение фаговой ДНК в бактериальную клетку. Кроме того, благодаря высокой специфичности бактериофагов их можно рассматривать как инструмент идентификации *K. pneumoniae* разных капсульных типов, включая серотип К-1.

Целью данного исследования является выделение и характеристика бактериофагов, специфичных по отношению к бактериям *K. pneumoniae* серотипа К-1.

В экспериментах использовали 77 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из клинического материала. Методом ПЦР со специфическими праймерами в коллекции было выявлено 11 штаммов серотипа К-1, девять из которых обладали гипермукоидным фенотипом (подтверждено положительным стринг-тестом и выявлением гена *gmpA* в ПЦР). Следует отметить, что бактерии этих штаммов обладали наиболее выраженной вирулентностью для аутбредных мышей (LD_{50} менее 100 КОЕ).

Для выделения бактериофагов использовали пробы сточных вод, стоков птичников и животноводческих комплексов и клинического материала. Выделено шесть бактериофагов, лизирующих бактерии *K. pneumoniae* серотипа К-1. Установлено, что пять из них лизируют только штаммы *K. pneumoniae* серотипа К-1, один фаг – штаммы серотипа К-1, К-57 и штаммы не определенного К-типа. Один из К-1 специфичных бактериофагов лизирует все имеющиеся в коллекции штаммы *K. pneumoniae* серотипа К-1 (11 штаммов), остальные – не менее 90 % штаммов этого серотипа.

На газоне бактериальных культур на плотной питательной среде все выделенные бактериофаги образуют прозрачные негативные колонии с ореолом, наличие которого свидетельствует о продукции фагами растворимого фермента, подобного экзополисахарид деполимеразам.

По данным рестрикционного анализа, проведенного с использованием эндонуклеаз рестрикции HindIII и EcoRV, геномы бактериофагов содержат двухцепочечную ДНК размером не более 50 kb, что характерно для фагов семейства *Podoviridae* (принадлежность одного фага КрV41 к данному семейству подтверждена данными электронной микроскопии). По характеру распределения фрагментов рестрикции ДНК в геле 1 % агарозы бактериофаги отличаются друг от друга. Различие бактериофагов также подтверждается данными белкового SDS-электрофореза в полиакриламидном геле.

Таким образом, в результате проведенных исследований выделены и охарактеризованы бактериофаги, лизирующих бактерии *K. pneumoniae* капсульного типа К-1. Полученные результаты являются хорошей предпосылкой для проведения исследований по использованию бактериофагов и фаговых деполимераз для разработки лечебно-профилактических препаратов против инфекций, вызванных наиболее вирулентными представителями вида *K. pneumoniae* - гипермукоидными штаммами серотипа К-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Соглашение № 15-15-00058).

Использование атомно-силовой микроскопии и MALDI масс-спектрометрии для сравнения *Acinetobacter baumannii* в планктонной культуре и в биопленке

Детушева Е.В., Детушев К.В., Фурсова Н.К.

Отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск

Acinetobacter baumannii – неферментирующие грамотрицательные бактерии, относящиеся к числу важных госпитальных патогенов. Они являются причиной ~20% инфекций дыхательной и мочевыводящей систем в отделениях реанимации и интенсивной

терапии. Летальность ассоциированных с *A. baumannii* инфекций достигает 40 % пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Это связано с характерной для *A. baumannii* множественной, экстремальной и пан резистентностью к применяемым антимикробным препаратам (АП). Одним из факторов устойчивости, является формирование биопленок на пораженных тканях, стенках катетеров и других поверхностях. Показано, что образование биопленок у всех бактерий ассоциировано с формированием полимерного внеклеточного матрикса, а у *A. baumannii*, кроме того – с образованием пиле-подобных структур.

Цель работы – визуализация с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) морфологических различий клеток *A. baumannii* в планктонном состоянии и в составе биопленки, а также сравнение белковых масс-спектров планктонных клеток и биопленок полученных различными методами. Штамм *A. baumannii* В-1745 выделен из эндотрахеального аспирата пациента отделения реанимации и интенсивной терапии г. Москвы в 2013 году. Планктонные клетки получали суспендированием в стерильной дистиллированной воде одной колонии суточной культуры, выращенной на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) при температуре 37°C.

Биопленки *A. baumannii* получали двумя методами:

- на разделе фаз жидкость – твердая поверхность путем культивирования в бульоне Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) на купоне из полистирола, при температуре 37°C в течение 72 ч, с интенсивностью качания 120 об/мин, как описано у Orsinger-Jacobsen et al. (2013);

- на разделе фаз твердая поверхность – воздух выращивая на плотной питательной среде (агар Мюллера-Хинтона) течение 7 суток при температуре 37 °C.

Чувствительность к АП определяли, как описано ранее (Детушева и др., 2015).

Микроскопию планктонных клеток и биопленки, нанесенных на поверхность слюдяной пластинки, проводили на АСМ микроскопе SmartSPM (ООО «Аист NT», Москва).

Пробоподготовку образцов для масс-спектрометрии на приборе MALDI-TOF microflex (BrukerDaltonik, Германия), проводили по стандартной методике, рекомендованной производителем прибора. Обработку полученных белковых масс-спектров проводили с использованием программы flexAnalysis (Bruker Daltonik, Германия).

Показано, что клетки штамма *A. baumannii* В-1745 устойчивы к 19 АП, относящимся к 8 функциональным классам (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, тетрациклины, аминогликозиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, нитрофураны), т.е. данный штамм является экстремально резистентным. В планктонной форме клетки этого штамма проявляли чувствительность к антисептику хлоргексидину (МБК=0,0016%), в то время как биопленки были устойчивы (МБК=0,16 %).

Анализ АСМ изображений показывает, что в планктонных культурах клетки имеют размер 1 x 2,5 мкм, их границы четко очерчены, вокруг них отсутствует ореол (Рис.1, а)). В 24-часовой культуре наблюдаются конгломераты плотно сомкнутых клеток, границы которых четко очерчены (Рис.1, б)), а в 168-часовой культуре – клетки с размытыми границами, «погруженные» в межклеточный матрикс (Рис.1, г)). Отдельно лежащие клетки, вычлененные из биопленки, окружены густой сетью пиле-подобных структур (Рис.1, в)).

При исследовании на масс-спектрометре белковых экстрактов биопленок, выращенных двумя разными способами, были получены идентичные спектры, но по

интенсивности и разнообразию пиков в значительной степени, отличающиеся от спектров планктонных клеток.

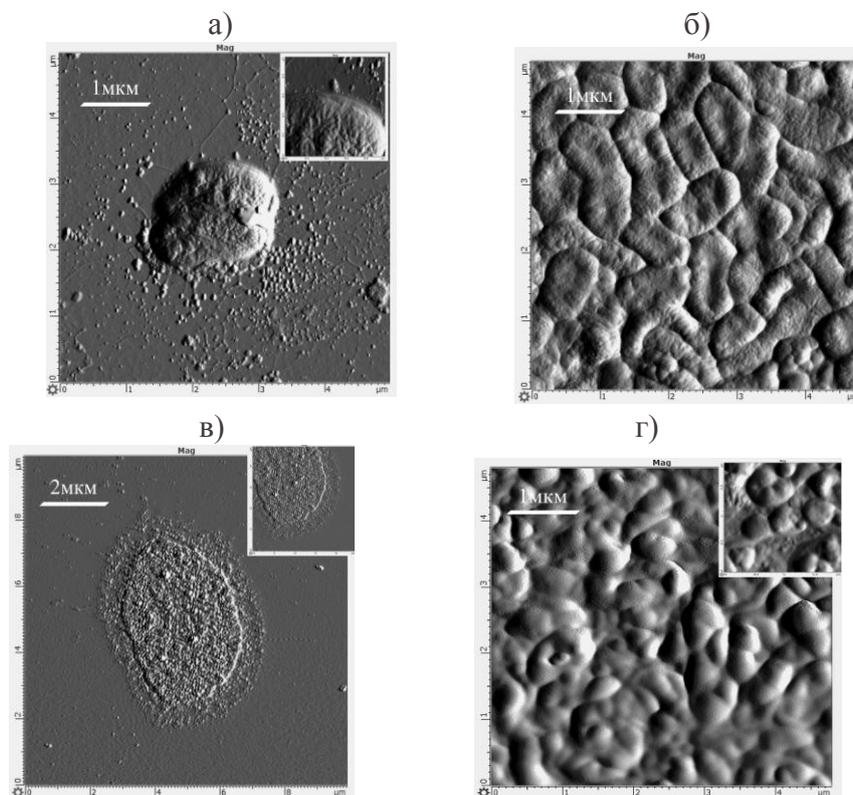


Рис.1. АСМ-изображение нанесённых на слюду клеток *A. baumannii* B-1745, записанное по каналу «отклонение»

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- планктонные клетки клинического штамма *A. baumannii* B-1745 и клетки этого штамма в составе биопленки имеют значительные различия в морфологии, выражающиеся в наличии пиле-подобных структур у последних. АСМ микроскопия поверхности биопленки выявила наличие в данной структуре межклеточного матрикса, количество которого увеличивается в ходе культивирования;

- при MALDI масс-спектрометрическом исследовании белковых экстрактов биопленок, выращенных двумя разными способами, были получены полностью идентичные между собой спектры, в значительной степени, отличающиеся от спектров белковых экстрактов планктонных клеток;

- таким образом, показана принципиальная возможность применения методов масс-спектрометрии и атомно-силовой микроскопии для сравнения морфологии и белковых масс-спектров планктонных клеток и биопленок, в том числе - при изучении устойчивости *A. baumannii* к антимикробным препаратам.

Взаимодействие штаммов непатогенных иерсиний с факторами врожденного иммунитета человека

Киршева Н.А., Шайхутдинова Р.З., Титарева Г.М., Дентовская С.В.

Лаборатория микробиологии чумы ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск

В настоящее время род *Yersinia* семейства *Enterobacteriaceae* включает 17 видов (*Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. pekkanenii* и *Y. nurmii*), первые три из которых патогенны для человека. *Y. pestis* - возбудитель острого высоко летального системного заболевания – чумы. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* вызывают склонные к хроническому течению заболевания желудочно-кишечного тракта. Остальные, менее известные иерсинии, были выделены в отдельные виды в последние 40 лет из вида *Y. enterocolitica* или из вида *Y. pseudotuberculosis* на основании биохимических и серологических свойств или различий в нуклеотидной последовательности 16S РНК и генов «домашнего хозяйства».

Объектами настоящего исследования явились штаммы, принадлежащие к восьми непатогенным для человека видам *Yersinia* spp.: *Y. ruckeri* – патоген лососёвых рыб, наносящий значительный ущерб при их искусственном разведении; *Y. entomophaga* - выделен из личинок жесткокрылых насекомых *Costelytra zealandica* в Новой Зеландии; бактерии *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei* выделяют из воды, продуктов питания, испражнений человека и животных. Есть сообщения, связывающие некоторые из непатогенных видов иерсиний с развитием острых кишечных инфекций, а также свидетельствующие об их способности вызывать летальный инфекционный процесс у мышей.

Взаимодействие патогена с факторами врожденного иммунитета хозяина является важным этапом развития инфекции. Поэтому мы оценили устойчивость штаммов непатогенных иерсиний к бактерицидному действию нормальной человеческой сыворотки (НЧС) и катионных антимикробных пептидов на модели полимиксина В. Устойчивость к действию 80 %-ной человеческой сыворотки определяли путем сравнительной оценки воздействия интактной и термически обработанной для инактивации системы комплемента сыворотками (термоинактивированная человеческая сыворотка, тНЧС) на бактериальную взвесь с концентрацией 10000000 КОЕ/мл с последующим высевом на плотную питательную среду для подсчета выживших бактериальных клеток. Устойчивость к действию полимиксина В определяли методом серийных разведений для бактериальной взвеси с концентрацией 1000000 КОЕ/мл. В качестве контроля использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, устойчивый к бактерицидной активности полимиксина В и комплемента сыворотки.

По сравнению с чумным микробом, большинство штаммов непатогенных иерсиний оказались высокочувствительны к бактерицидному действию полимиксина В (МПК \leq 3,5 мкг/мл). У одного штамма *Y. rohdei*, четырех штаммов *Y. intermedia* и штамма *Y. entomophaga* МПК полимиксина В была ниже в 2 раза (250 мкг/мл), у двух штаммов *Y. mollaretii* приблизительно в 2,5 раза (187,5 мкг/мл), а у одного штамма *Y. kristensenii* в 8 раз (62,5 мкг/мл) по сравнению с МПК устойчивого штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (500 мкг/мл). Штаммы *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* и *Y. entomophaga* обладали устойчивостью к действию комплемента НЧС. Из 11 изученных культур *Y. mollaretii* у четырех наблюдали значительное снижение жизнеспособности клеток в процессе инкубации с НЧС по сравнению с инкубацией в сыворотке с инактивированным путем нагревания комплементом. Среди четырех штаммов *Y. frederiksenii* и шести

штаммов *Y. intermedia* одна и две культуры, соответственно, оказались высокочувствительны действию комплемента НЧС. Штаммы *Y. rohdei*, *Y. intermedia* и *Y. entomophaga* и *Y. mollaretii*, устойчивые к литической активности полимиксина В, были одновременно устойчивы и к бактерицидной активности комплемента сыворотки. Среди культур, чувствительных к полимиксину В, часть была одновременно чувствительна к комплементу, другая часть сохраняла устойчивость к его действию.

Таким образом, впервые определены МИК полимиксина В и устойчивость/чувствительность к бактерицидному действию нормальной человеческой сыворотки для 36 штаммов непатогенных для человека иерсиний, представляющих виды *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. intermedia* и *Y. entomophaga*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08058 А.

Изучение конкуренции медиатора электронного транспорта и кислорода в условиях микробного биотопливного элемента

Возчикова С.В., Алферов С.В.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Биотопливный элемент (БТЭ) – это биотехнологическое устройство, способное генерировать электроэнергию за счет окисления органических субстратов микроорганизмами, которые выступают в качестве биокатализатора. В качестве эффективного биокатализатора в макете БТЭ нашли применение уксуснокислые бактерии *Glucobacter oxydans*. Эти микроорганизмы обладают уникальной организацией метаболической системы, характеризующейся мембранной локализацией основных ферментов клеточного метаболизма – дегидрогеназ, что обеспечивает легкий доступ субстрата к активным центрам фермента.

Помимо целых клеток микроорганизмов в БТЭ возможно применение мембранной фракции бактерий *G. oxydans*. Это может увеличить энергетические параметры БТЭ, а также позволит избежать необходимости выделения индивидуальных ферментов, получение которых является длительным и материально затратным процессом. Кроме того, для БТЭ является приоритетным использование широкого спектра субстратов, что можно достичь применением мембранной фракции, содержащей различные мембранлокализованные дегидрогеназы.

Биокатализатор в БТЭ может быть представлен как в суспендированном виде, так и быть закрепленным непосредственно на поверхность графитового электрода. Имобилизация биоматериала на поверхности анода, в отличие от суспензии, позволяет многократно использовать применяемый биокатализатор, что в свою очередь увеличивает долговременную стабильность БТЭ, а также способствует более быстрому и эффективному переносу электронов на электрод.

Для аэробных бактерий *G. oxydans*, кислород является естественным конечным акцептором электронов. Присутствие в анодном отделении кислорода может негативно сказываться на работе элемента, т.к. может наблюдаться конкуренция между естественным и искусственным акцепторами электронов. Для оценки возможной конкуренции между двумя акцепторами электронов в условиях работы БТЭ необходимо

провести изучение скоростей потребления кислорода разными видами биокатализаторов в анодном пространстве в режиме замкнутой внешней цепи. Таким образом целью данной работы являлась оценка изменения концентрации кислорода в анодном пространстве БТЭ на основе различных биокатализаторов и в случае отсутствия и присутствия в системе медиаторов электронного транспорта.

Оценку скорости восстановления кислорода в анодном отделении БТЭ осуществляли в системе: биокатализатор (целые клетки *G. oxydans* микроорганизмов или их мембранная фракция), фоновый электролит, глюкоза и медиаторы электронного транспорта (2,6-дихлорфенолиндофенол, феназинметасульфат, гексацианоферрат калия). По полученным данным была проведена сравнительная оценка (Табл. 1).

Таблица 1

Скорость восстановления кислорода в макетах БТЭ
с биокатализаторами на основе *G. oxydans*

Тип биокатализатора	Скорость восстановления кислорода, нормированная на единицу биокатализатора, мкмоль/с·г
Суспензия бактерий (в присутствии медиатора)	8,4 ± 0,6
Суспензия бактерий (в отсутствии медиатора)	6,9 ± 0,9
Суспензия мембранной фракции (в присутствии медиатора)	2,07 ± 0,3
Суспензия мембранной фракции (в отсутствии медиатора)	2,10 ± 0,02
Иммобилизованные на аноде клетки бактерий (в присутствии медиатора)	0,22 ± 0,03
Иммобилизованные на аноде клетки бактерий (в отсутствии медиатора)	0,180 ± 0,004
Иммобилизованная на аноде мембранная фракция бактерий (в присутствии медиатора)	0,024 ± 0,002
Иммобилизованная на аноде мембранная фракция бактерий (в отсутствии медиатора)	0,022 ± 0,001

Скорость восстановления кислорода в БТЭ суспензией бактерий *G. oxydans* в 10 и 100 раз превышает значения, полученные для БТЭ на основе иммобилизованных клеток и иммобилизованной мембранной фракции на поверхности анода, соответственно. Это объясняется тем, что окисление субстрата и связанное с этим потребление кислорода свободными клетками бактерий происходит во всем объеме анодной ячейки, в то время как иммобилизованные клетки способны окислять субстрат и потребляют кислород только в приэлектродном пространстве. Таким образом, скорость потребления кислорода в объеме анодного отделения иммобилизованными бактериями значительно ниже чем у свободносuspendированных клеток бактерий *G. oxydans*. Кроме того, способность потреблять кислород мембранной фракцией на порядок ниже, чем для целых клеток, что может объясняться функциональностью всего набора ферментов и полной дыхательной цепи в составе целых клеток бактерий. Независимо от типа биокатализатора скорость восстановления кислорода в БТЭ в случаях присутствия и отсутствия медиатора электронного транспорта практически не отличаются. Это свидетельствует о том, что, в рассматриваемой системе отсутствует конкуренция между кислородом и медиатором

электронного транспорта при акцепции электронов с восстановительных сайтов биокатализатора.

Работа выполнена по государственному заданию в сфере научной деятельности Минобрнауки РФ.

"Живые" гибриды на основе инкапсулированных в органосиликатную матрицу метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha*

Бурмистрова Т.В.¹, Каманина О.А.¹, Лаврова Д.Г.¹, Мачулин А.В.²

¹ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

²Лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН

В процессе эволюции природных систем живые организмы развивают различные минерализованные структуры, которые служат для их защиты и генетического материала своего вида от неблагоприятных условий. Диатомовые водоросли и радиолярии — одноклеточные организмы, которые эволюционировали таким образом, что стали способны формировать силикатные капсулы на своей поверхности, образуя экзоскелет для обеспечения такой защиты. Эти организмы вдохновили исследователей на создание гибридных биоматериалов, так называемых «искусственных спор» [1], на основе живых клеток, инкапсулированных в органические и неорганические оболочки. Особый интерес представляют полимерные структуры на основе соединений кремния, которые обеспечивают сохранение физиологической активности живых клеток, эффективную защиту их от теплового, механического, биологического воздействия.

Для получения таких биогибридных материалов применяют золь-гель метод, который не требует энергоемкого, дорогого оборудования, является экономичным, экологически чистым и позволяет формировать силикагели, в том числе модифицированные органическими соединениями, с различной наноструктурой, что обеспечивает возможность управления функциональными свойствами создаваемых биогибридных материалов. В большинстве исследований используется кислотный катализ, который приводит к быстрому формированию плотной структуры гелей в виде хрупких стекол, что не всегда приемлемо для иммобилизации живых клеток. Нами было предложено использовать основной катализ, поскольку в этих условиях удастся обеспечить благоприятные условия жизнедеятельности микроорганизмов, а также контролировать процесс образования силикатных оболочек вокруг живых клеток. Ранее основной катализ не применяли для иммобилизации микроорганизмов.

Следует отметить, что при иммобилизации живых клеток в силикатные материалы, в процессе конденсации выделяются спирты, токсичные для живых организмов. Для метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* низкомолекулярные спирты являются природными субстратами, поэтому эти микроорганизмы имеют активную систему их окисления, что обеспечивает им значительный биотехнологический потенциал. Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* характеризуются наличием высокоактивной алкогольоксидазы. Алкогольоксидаза метилотрофных дрожжей имеет значительный потенциал широкого применения в аналитической практике, и, прежде всего для определения содержания спиртов, в частности, этанола и метанола. В отличие от НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы (АДГ), АО содержит прочно связанный ФАД, которому не требуется добавление экзогенного кофактора. Кроме того, оксидазная

реакция является необратимой, что снижает проблемы, возникающие в случае алкогольдегидрогеназного метода определения этанола. Нами было предложено использовать эти дрожжи для получения биогибридных материалов золь-гель методом без промежуточной стадии удаления спирта.

При инкапсулировании метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 в органосиликатную матрицу вокруг каждой клетки формируется капсула, представляющая собой мелкие сферические частицы органосиликатного полимера, прочно связанные между собой (рис. 1).

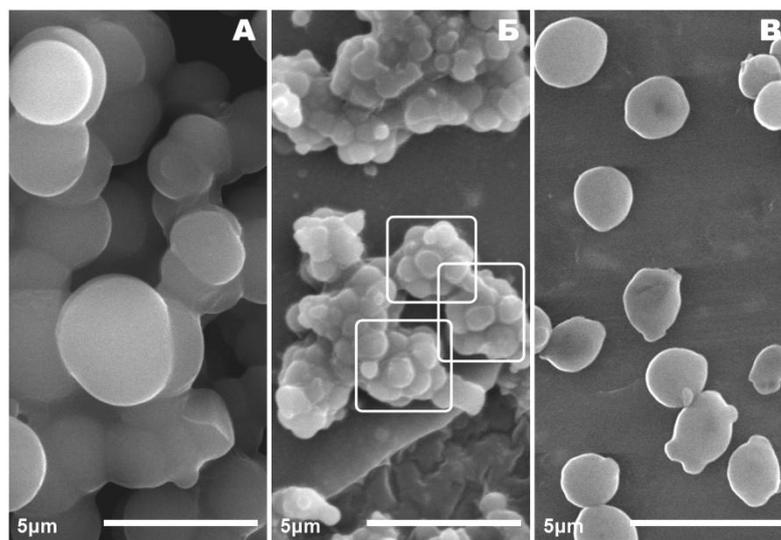


Рис. 1. СЭМ изображение А) золь-гель матрица; Б) золь-гель матрицы с инкапсулированными метилотрофными дрожжами *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 (рамками на рисунке выделены капсулы, содержащие дрожжи *Og. polymorpha*); В) суспензия метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559

Ранее в нашем научном коллективе было показано, что органосиликатная оболочка вокруг живых клеток обеспечивает их защиту от повреждающего воздействия ионов тяжелых металлов, УФ-излучения и кислотности среды, что свидетельствует о защитной функции органосиликатной капсулы. Поэтому полученные биогибридные материалы можно применять в технологии очистки метанольных стоков.

Кроме того, инкапсулированные метилотрофные дрожжи можно использовать в биосенсорах для контроля процессов брожения, при определении биологического потребления кислорода, при осуществлении контроля качества спиртных напитков. Предлагаемую методику инкапсулирования микроорганизмов в дальнейшем можно адаптировать для иммобилизации других клеток, что важно при разработке биогибридных материалов в тканевой инженерии, систем транспортировки лекарственных средств, биокатализаторов для автономной канализации и систем водоочистки.

Работа выполнена по государственному заданию в сфере научной деятельности Минобрнауки РФ (Задание № 2014/227).

Список литературы:

1. Yang S. H., Hong D., Lee J., Ko E. H., Choi I. S. Artificial Spores: Cytocompatible Encapsulation of Individual Living Cells within Thin, Tough Artificial Shells // Small. – 2013. – V. 9, I. 2. – P. 178-186.

Определение показателя интегрального загрязнения воды на основе изменения метаболической активности дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* ВКМ У -2482, защищенных органосиликатной оболочкой

Афони́на Е.Л., Лаврова Д.Г., Камани́на О.А., Понаморева О.Н.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Современные строгие требования к экологическому состоянию окружающей среды диктуют необходимость использования экспресс-методов контроля биохимического потребления кислорода (БПК) в водных объектах. Эти методы, основанные на применении БПК-биосенсоров, позволяют сократить время анализа с 5 суток до нескольких минут. При разработке таких биоаналитических систем используют микроорганизмы как чувствительные элементы биосенсора, в частности дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ У -2482, поскольку они обладают высокой метаболической активностью и способны окислять большой спектр веществ.

Под действием токсичных соединений может нарушаться биологическая активность биоматериала. Для того чтобы этого избежать, разработаны различные методы иммобилизации микроорганизмов. Особый интерес представляет инкапсулирование живых клеток в силикатные полимеры, поскольку неорганические материалы являются естественной средой обитания для многих микроорганизмов. Такие «живые» гибридные материалы являются перспективными при разработке целоклеточных биосенсоров [1].

Для получения клеток, иммобилизованных в модифицированные силикаты, использовали тетраэтоксисилан (ТЭОС) и метилтриэтоксисилан (МТЭС) в объемном отношении 15/85 и полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 3000. Синтез проводили в условиях основного катализа с использованием NaF. В данных условиях вокруг каждой клетки формируется капсула из сферических частиц органосиликатного полимера (рис.1), которая служит защитой оболочкой от токсического воздействия внешней среды и от повреждающих факторов окружающей среды, что важно для стабильного функционирования биосенсоров на основе целых клеток микроорганизмов.

Аналитические и метрологические характеристики разработанного БПК-биосенсора показали, что он характеризуется повышенной чувствительностью и стабильностью по сравнению с другим биоаналитическими системами на основе *Debaryomyces hansenii* ВКМ У -2482, иммобилизованных в гель поливинилового спирта (ПВС) [2].

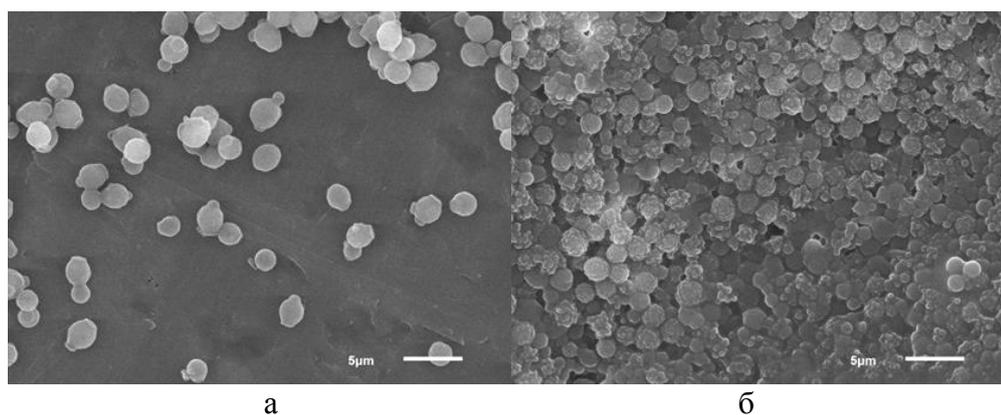


Рис.1. а- изображение клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У -2482 чистой культуре (СЭМ).
б - Изображение золь-гель матрицы с инкапсулированными дрожжами *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 (СЭМ)

С целью апробации и коррелятивной калибровки разработанного нами биораспознающего элемента, определяли БПК в модельных образцах вод из водных источников Тульской области (Российская Федерация). В качестве референтного метода применяли стандартный метод определения БПК. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Определение БПК в реальных образцах

Образец воды	Способ измерения БПК, мгО ₂ /дм ³	
	С помощью биосенсора	Стандартный метод (БПК ₅)
Колодец Болхво	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,5
Скуратово Талая 1	5 ± 1	4,9 ± 0,3
Скуратово Талая 2	5,2 ± 0,2	5 ± 1

Статистический анализ результатов определения БПК показал, что выборки, полученные двумя методами, однородны по воспроизводимости. Значения БПК, определяемые с помощью биосенсора на основе инкапсулированных дрожжей и стандартным методом, незначимо отличаются между собой. Таким образом, биосенсор на основе инкапсулированных в органосиликатную матрицу дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У - 2482 является перспективным инструментом для мониторинга загрязнений сточных вод.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России ГЗ №1764.

Список литературы:

1. Depagne C, Roux C, Coradin T. How to design cell-based biosensors using the sol-gel process. Analytical and bioanalytical chemistry. 2011;400:965-76.
2. Arlyapov VA, Yudina NY, Asulyan LD, Alferov SV, Alferov VA, Reshetilov AN. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone. Enzyme and microbial technology. 2013;53:257-62.

Выделение фермента алкогольоксидазы из клеток

метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* NCYC 4951n

Зайцева Д.Ю., Зайцев М.Г.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Экспресс-анализ содержания спиртов в спиртосодержащих жидкостях и ферментационных средах необходим при производстве и хранении алкогольных напитков в проведении контроля параметров различных биотехнологических процессов.

Современные экспресс методы биоанализа основаны на использовании биосенсоров, которые характеризуются экспрессностью и экономичностью, достаточным уровнем чувствительности и избирательности. При экспресс определении содержания низших спиртов наибольшее развитие получили электрохимические биосенсоры на основе иммобилизованного фермента алкогольоксидазы (АО), принцип работы которых заключается в измерении концентрации кислорода или образующегося пероксида водорода в приэлектродном пространстве. Основным источником АО являются метилотрофные дрожжи

В настоящее время коммерческий препарат алкогольоксидазы отличается высокой стоимостью и существует серьезная проблема увеличения стоимости биосенсорных анализаторов на основе иммобилизованного коммерческого фермента.

В связи с этим актуальной задачей является разработка методики выделения и очистки фермента алкогольоксидазы из клеток метилотрофных дрожжей для последующего использования в биосенсорных системах.

Для выращивания микроорганизмов использовали питательную среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5г.), MgSO_4 (0,2г.), K_2HPO_4 (0,7г.), NaH_2PO_4 (3г.), дрожжевой экстракт (Тип д) (0,5 г.), DL Лейцин (0,17г.), глицерин (8,3мл), микроэлементы (1мл). Культуру выращивали в шейкере - инкубаторе (180 об/мин) при 28 °С в колбах Эрленмейера с 200 мл среды. Инокулят вносили в количестве 5% по объему среды. Условия стерилизации: Время – 60 мин., температура – 120 °С, давление – 1 атм (сверх атмосферного давления).

Осажденную биомассу переносили в колбу с 200 мл питательной среды и добавляли метанол до концентрации 1% об. Колбу помещали в шейкер - инкубатор на 24ч (Т=28 °С, 180 об/мин). Полученную биомассу осаждали центрифугированием при 8000g в течение 15 мин. Дрожжевые клетки помещали в морозильную камеру (Т= -20 °С), чтобы увеличить время хранения.

Для выделения АО из дрожжевых клеток проводили ультразвуковое разрушение, которое является наиболее эффективным и мягким методом разрушения. Клетки (7,18г) ресуспендировали в 10мл калий натрий фосфатного буферного раствора pH7,6 и разрушали на УЗ диспергаторе УЗД 1-0.1/22 при температуре = 2-6 °С: 6 циклов по 20 секунд с интервалом 15 секунд., клеточный дебрис осаждали на центрифуге BeckmanJ-301 (12000 об./мин., 30 мин, 4°С). Супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Для отделения сторонних белков от АО использовали метод ступенчатого высаливания. Процедуру проводили в 3 этапа следующим способом: в супернатант вносили сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (осч) до 30 % от насыщения. После растворения соли экстракт выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием на BeckmanJ-301 (8000 g, 10 мин.). Затем в супернатант вновь вносили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 70 % от насыщения, растворяли и осадок отделяли центрифугированием. На последнем этапе вносили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 100 % от насыщения и проводили аналогичные процедуры. На

каждом этапе осаждения определяли содержание белка и удельную ферментативную активность алкогольоксидазы. Осадки с максимальной алкогольоксидазной активностью отбирали для последующей финальной очистки от сопутствующих белков методом ионообменной хроматографии.

В таблице 1 представлены значения общего содержания белка и удельной алкогольоксидазной активности на разных этапах высаливания.

Фракция	Общее содержание белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка
Супернатант после разрушения	26,9	0,57
Супернатант после высаливания 30% от насыщения	20,9	0,27
Осадок после высаливания 30% от насыщения	3,5	1,32
Супернатант после высаливания 70% от насыщения	6,0	0,004
Осадок после высаливания 70% от насыщения	4,0	1,80
Супернатант после высаливания 100% от насыщения	0,3	0,06
Осадок после высаливания 100% от насыщения	0,5	0,03

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что основная масса алкогольоксидазы осаждается на этапе высаливания при концентрации сульфата аммония 70% от насыщения. Белковый препарат, взятый на этой стадии после дополнительной очистки, может быть использован в дальнейшей работе.

Влияние температуры на способность бактерий-эффективных нефтеструктуров *Rhodococcus sp.S67* продуцировать гликолипидные биосурфактанты

Льонг Т.М.¹, Нечаева И.А.¹, Петриков К.В.²

¹ ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

² Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

В связи с интенсивным развитием добычи и транспортировки нефти на территориях с холодным климатом, происходит загрязнение окружающей среды углеводородами, которые значительно влияют на экологические процессы в этих регионах. При низких температурах содержание углеводородов на загрязненных территориях остается высоким в течении длительного времени, так как процессы естественного восстановления экосистем протекают с очень низкой скоростью, одновременно снижается биодоступность, растворимость и испарение компонентов нефти, увеличивается их вязкость и токсичность, замедляются процессы диффузии, в результате значительно уменьшается степень и скорость биodeградации под действием

природных микроорганизмов. Поэтому решение проблемы антропогенного загрязнения окружающей среды гидрофобными компонентами нефти в условиях холодного климата относится к первоочередным экологическим задачам. Одним из эффективных подходов для ремедиации загрязненных территорий является применение биопрепаратов, содержащих микроорганизмы-нефтедеструкторы, которые способны активно утилизировать гидрофобные субстраты в экстремальных условиях окружающей среды за счет своей метаболической активности. Важную роль в процессе биodeградации гидрофобных соединений играют поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами (биоПАВ, биосурфактанты). Бактерии рода *Rhodococcus* часто входят в состав биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных сайтов. Для этих бактерий характерна способность адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды. Однако, практически нет данных о биосурфактантах, которые родококки продуцируют при низких температурах.

В данной работе исследовали влияние температуры на способность бактерий *Rhodococcus sp.S67*, входящих в состав биопрепарата «МикроБак», продуцировать гликолипидные биосурфактанты в культуральную среду в присутствии н-гексадекана как единственного источника углевода и энергии.

Культивирование бактерий *Rhodococcus sp.S67* при 10°C проводило к изменению физико-химических показателей культуральной среды, таких как поверхностное натяжение, содержание трегалолипидов, гидрофобность клеточной поверхности, что свидетельствует о способности этих бактерий продуцировать гликолипидные биосурфактанты при пониженных температурах. Это важно для биоремедиации нефтезагрязненных территорий с холодным климатом.

После 12 суток культивирования наблюдалось снижение поверхностного натяжения с 72 мН/м только до 45 мН/м, в то время как при 26°C до 28 мН/м (рис. 1а, б, кривая 2). Степень адгезии клеточной поверхности на стационарной фазе роста к гексадекану, которую определяли МАТН-тестом, составила 51%, что незначительно меньше, чем при росте микроорганизмов в оптимальных условиях (61%). Содержание трегалолипидов в бесклеточном супернатанте увеличивалось до 100 мг/л (рис. 1б, кривая 3), в то время как в оптимальных условиях - 280 мг/л (рис. 1а, кривая 3). Таким образом, при пониженных температурах микроорганизмы продуцируют биосурфактанты в меньшей степени. Качественный анализ биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии показал, что *Rhodococcus sp. S67* продуцирует два основных гликолипида, различающихся по хроматографической подвижности (моно- и дисукцинолтрегалоллипиды). Похожие результаты были получены нами ранее при температуре культивирования 26°C [1]. Однако соотношение трегалолипидных компонентов при пониженной температуре изменяется. При 10°C бактерии *Rhodococcus sp.S67* продуцируют преимущественно моносукцинолтрегалоллипиды, тогда как при 26°C образуется в основном дисукцинолтрегалоллипиды. Такое влияние температуры на способность бактерий продуцировать разные трегалолипиды показано впервые, и может быть одним из механизмов адаптации бактерий к экстремальным температурам среды.

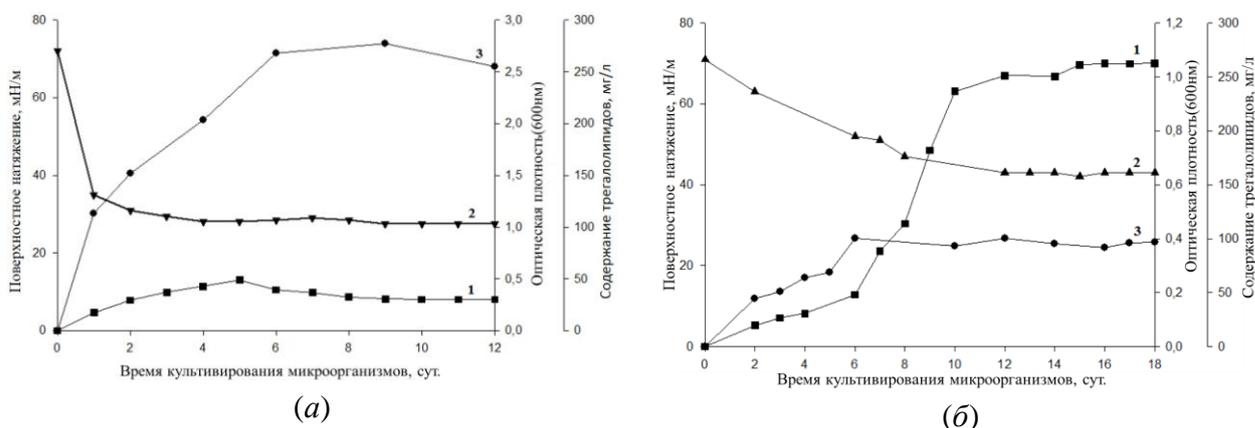


Рис. 1. Кривая роста бактерий *Rhodococcus sp. S67* (ОП_{600nm}, 1), поверхностного натяжения среды (2) и накопления трегалолипидов в бесклеточной культуральной среде (3) (а) – при температуре 26°C; (б) – при температуре 10°C

Дальнейшее выяснение механизмов адаптации бактерий к низким температурам при участии гликолипидных биосурфактантов позволит целенаправленно создавать эффективные биопрепараты для очистки нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата.

Список литературы:

1. Petrikov K., Delean Y., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure// *Process Biochemistry*. 2013. V48, N(5-6). P.931-935.

Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения Тульской области по отношению к ионам Рb(II)

Леонтьева М.М.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

В настоящее время во всем мире большое внимание уделяется разработке новых, эффективных сорбентов, обладающих детоксицирующим действием по отношению к поллютантам различной природы, например, к тяжелым металлам. Природные представители таких сорбентов – гуминовые вещества. Они контролируют геохимические потоки тяжелых металлов в окружающей среде. Данное обстоятельство определяет важность и актуальность изучения гуминовых веществ как основы их реакционной способности в отношении тяжелых металлов, а так же установления количественных взаимосвязей между структурой и свойствами гуминовых веществ.

Цель работы – определить сорбционную и детоксицирующую способность гуминовых веществ торфов различного происхождения Тульской области по отношению к ионам Рb(II).

В качестве объекта исследования использованы гуминовые вещества, выделенные из торфов различного происхождения Тульской области: черноольхового низинного и

сфагнового переходного торфа, экстракцией 0,1 Н NaOH по методике, рекомендованной Международным обществом по исследованию гуминовых веществ. Содержание ионов Pb(II) в растворе над гуминовыми веществами в процессе сорбции определяли атомно-абсорбционной спектрометрией.

Сорбируемость ионов Pb(II) рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = \frac{(C_0 - C) \cdot V}{m}$$

где Γ – сорбируемость ионов свинца, мг/г; C_0 – концентрация свинца в исходном растворе, (1 мг/дм³); C – равновесная концентрация свинца (мг/дм³); V – объем исходного раствора свинца, (0,04 дм³); m – навеска сорбента, (0,09 г);

Строили изотерму сорбции ионов Pb(II) на ГВ (рис. 1)

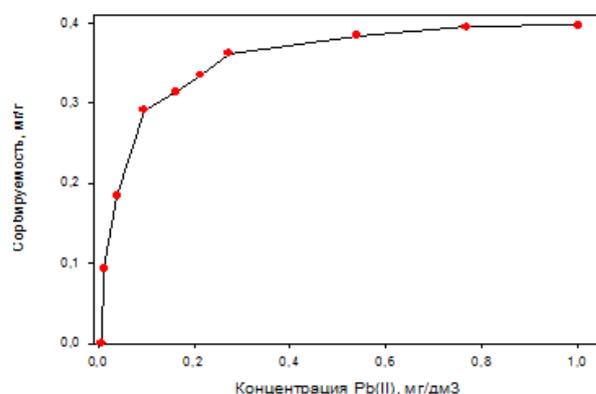


Рис.1. Изотерма сорбции катионов Pb(II) на гуминовых веществах, выделенных из черноольхового низинного торфа

Рассчитали параметры изотерм адсорбции катионов Pb(II) на гуминовых веществах различного происхождения по уравнениям Ленгмюра и Фрейндлиха (табл. 1).

Сорбция ионов Pb(II) на ГВ подтверждается экспериментами по изучению изменения pH растворов металлов над гуминовыми веществами во времени.

Методом конкурентного комплексообразования рассчитаны константы устойчивости нерастворимых комплексов «гуминовое вещество – металл»: $K_{уст. (ГВ-Pb(II))_{чнт.}} = 3 \cdot 10^6$, $(ГВ-Pb(II))_{спт.} = 1 \cdot 10^6$ (1).

Детоксицирующую способность гуминовых веществ по отношению к ионам Pb(II) оценивали методом биотестирования.

Для выбора тест-объекта проводили скрининг микроорганизмов. Наибольшую чувствительность к ионам Pb(II) проявил штамм *Debaryomyces hansenii J-158*.

Аналитическая концентрация металла, при которой наблюдается незначительный рост микроорганизмов, равна 4 ПДК Pb(II) (120 мг/л). Биологическое действие ГВ на клетки микроорганизмов изучалось в диапазоне концентраций 25 мг/л, 35 мг/л, 50 мг/л и 75 мг/л. Рассчитывали коэффициенты детоксикации (D) и константы детоксикации ($K_{дет.}$):

$$D = 1 - \frac{R_0 - R_{d+т}}{R_0 - R_t}$$

где R_0 - тест-отклик в контроле; R_t — тест-отклик в присутствии токсиканта; R_{d+t} - тест-отклик при совместном присутствии токсиканта и детоксиканта.

$D(\text{ГВ-Pb(II)-D.Hansenii})_{\text{чнт.}}$: от 0,218 до 0,598, $K_{\text{дет.}} = 0,008$; $D(\text{ГВ-Pb(II)-D.Hansenii})_{\text{спт.}}$ от 0,308 до 0,912, $K_{\text{дет.}} = 0,012$. При минимальном значении коэффициента детоксикации происходит связывание иона Pb(II) с гуминовыми веществами только в растворе за счет образования комплексов Pb(II) - ГВ. При максимальном значении - помимо образования гуматов свинца в растворе, происходит связывание ионов Pb(II) с гуминовыми веществами, адсорбированными на поверхности клеток дрожжей (2).

Таблица 1
 Параметры изотерм адсорбции катионов Pb(II) на гуминовых веществах торфов различного происхождения

Изотерма Ленгмюра $\Gamma = \Gamma_{\infty} \frac{K_c}{1+K_c}$				
Система	Γ_{∞} , мг/г	K_c , г/мг	R	ΔG , кДж/моль
ГВ (Ченоольховый низинный торф)	0,4	1	0,994	-16
ГВ (Сфагновый переходный торф)	0,4	1	0,996	-16
Изотерма Фрейндлиха $\Gamma = KC^n$				
Система	K	n	R	
ГВ (Ченоольховый низинный торф)	0,008	1	1	
ГВ (Сфагновый переходный торф)	0,008	1	1	

Работа выполнена под руководством к.х.н. Дмитриевой Е.Д. в рамках гос. задания №5.241.2014/К

Список литературы:

1. Жилин Д.М., Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II) // Дисс. канд. хим. наук. - М. - 1997.
2. Семенов А.А., Влияние гуминовых кислот на устойчивость растений и микроорганизмов к воздействию тяжелых металлов // Дисс. канд. хим. наук, М. - 2009.

**БПК-биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii*,
 иммобилизованных в гель хитозана**

Козлова Т.Н., Арлянов В.А.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Биосенсоры на основе целых клеток микроорганизмов нашли широкое применение в экологических исследованиях и контроле биотехнологических процессов. Использование целых клеток в качестве биокатализатора в биосенсорах устраняет необходимость выделения индивидуальных ферментов, и позволяет активному

биоматериалу работать в условиях, близких к их естественной среде, а, следовательно, с более высокой эффективностью. В настоящее время важная роль отводится созданию микробных биосенсоров для определения биохимического потребления кислорода (БПК).

Применение дрожжей в качестве биокатализаторов является предпочтительным, чем применение бактериальных клеток, поскольку они более устойчивы к негативным факторам окружающей среды и могут функционировать длительное время. Для увеличения стабильности биорецепторного элемента применяют различные методы иммобилизации биоматериала. Эффективные методы получения иммобилизованных клеток связаны с процессами включения их в природные и синтетические гели путем перевода раствора полимера в твердую фазу за счет фазового перехода. В качестве природного гелеобразователя используют хитозан определенной молекулярной массы. Из литературных данных известно, что его применяют для иммобилизации ферментов и целых клеток, поскольку он обеспечивает высокий уровень диффузии субстратов и продуктов, а также полную невозможность для клеток покинуть матрицу геля.

Целью данной работы является разработка макета амперометрического БПК-биосенсора кюветного типа на основе дрожжевого штамма *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованного в полимерную матрицу хитозана, и определение его характеристик.

Для получения количественной информации о содержании анализируемых веществ в образце построили градуировочную зависимость отклика биосенсора от БПК в измерительной кювете. Для снижения ошибок анализа использовали линейный участок градуировочной кривой, ограниченный сверху концентрацией, численно равной константе Михаэлиса, K_m , а снизу – нижней границей определяемых концентраций. Таким образом, диапазон определяемых значений БПК для дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в полимерную матрицу хитозана, составил $1,3 - 65 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$.

Для определения эффективности биосенсоров используют количественную характеристику – чувствительность. Для биосенсоров чувствительность определяется, как максимальное значение производной величины отклика от концентрации. То есть коэффициент чувствительности характеризует отклик аналитического сигнала на содержание компонента. Коэффициент чувствительности биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* составил $90 \pm 6 \text{ с}^{-1} \times 10^{-5}$.

Операционная стабильность является одной из важнейших характеристик биосенсора. Она показывает устойчивость ответа сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата при проведении большого числа последовательных измерений. Ответ сенсора на основе штамма *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованного в пленку на основе хитозана, оставался стабильным на протяжении всех 15 измерений. Стандартное отклонение составило $0,0024 \text{ мг}/\text{дм}^3 \cdot \text{с}$, а относительное стандартное отклонение – 5,34 %.

Долговременная стабильность характеризует устойчивость работы сенсора в течение длительного периода времени. Долговременная стабильность биосенсора составляет 30 суток.

Дрожжи *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованные в полимерную матрицу хитозана, обладают широкой субстратной специфичностью и способны окислять многие спирты, углеводы, аминокислоты и другие органические вещества (рис. 1).

Проведен анализ образцов воды и продуктов брожения крахмалистого сырья с использованием разработанного макета БПК-биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в полимерную матрицу хитозана. Корреляция со стандартным методом составила $R=0,9987$. Значения БПК, определенные с помощью

биосенсора, различаются незначимо со значениями БПК, полученными стандартным методом.

Таким образом, дрожжи *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованные в рецепторный элемент на основе хитозана, подходят для создания рецепторного элемента БПК-биосенсора.

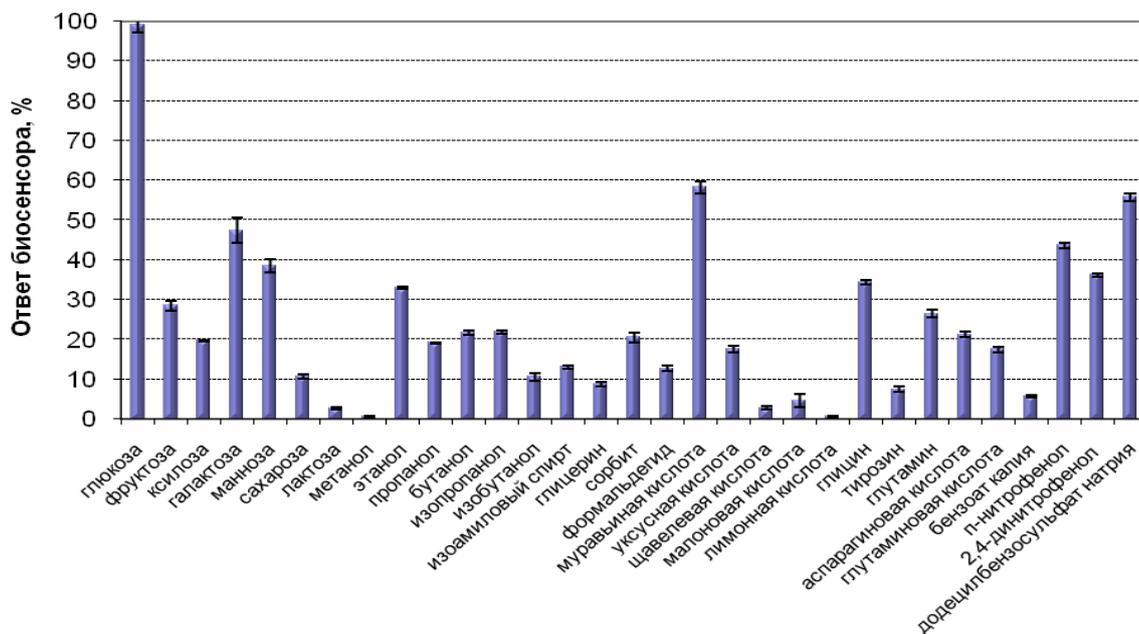


Рис. 1. Субстратная специфичность дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в матрицу хитозана

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы", соглашение № 14.574.21.0062.

Биоэлектрокаталитическое окисление субстратов дрожжами *Debaryomyces hansenii* в присутствии бимедиаторной системы ферроцен-метиленовый синий как основа БПК-сенсора

Шишкарёва Е.И., Зайцева А.С., Алферов В.А.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Разработка БПК-биосенсоров более чем актуальна. Ввиду длительности стандартной методики (5 суток с момента поступления пробы) могут возникать экологически опасные ситуации, связанные с поступлением на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или наоборот, недоочистка сточных вод в процессе регенерации. Биосенсорный метод определения БПК позволяет проводить анализ в течение нескольких минут. Использование различных медиаторов в сочетании с целыми клетками микроорганизмов открывает широкие возможности для создания биосенсоров в том числе для экспресс-анализа БПК. Применение соединений способных к переносу электронов от активных центров ферментов на электрод позволяет изменять рабочий

потенциал, а следовательно, регулировать протекание побочных реакций с участием электроактивных частиц.

Правильность работы любого БПК-биосенсора обеспечивается способностью рецепторного элемента окислять широкий спектр субстратов. Ранее отмечалось, что БПК-биосенсоры на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* характеризуется высокой долговременной стабильностью и чувствительностью (Arlyapov, 2013). Однако медиаторных БПК-биосенсоров на основе дрожжей разработано достаточно мало. Это связано, по-видимому, с тем, что взаимодействие медиаторов с ферментами эукариотических клеток затруднено. Для обеспечения доступа всех ферментов перспективно использовать двухмедиаторную систему, где один из медиаторов будет проникать внутрь дрожжевой клетки, и взаимодействовать с ферментами.

Целью данной работы стала разработка бимедиаторного БПК-биосенсора ферроцен-метиленовый синий на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Амперометрические измерения проводили с использованием рабочего углеродо-пастового электрода с иммобилизованными дрожжами. В качестве электрода сравнения брали хлорсеребряный электрод. Стандартный раствор метиленового синего вносили непосредственно в рабочий калий-натрий фосфатный буферный раствор, а медиатором ферроценом модифицировали поверхность электрода. Все измерения проводились при потенциале 250 мВ.

С использованием модельной системы на основе глюкозо-глутаматной смеси (ГГС) определены аналитические и метрологические характеристики рецепторного элемента. Долговременная стабильность составила 43 дня, длительность одного измерения - 3,5-6 минут, операционная стабильность - 1,2%, предел обнаружения БПК₅ - 0,8 мг/дм³, диапазон определяемых концентраций БПК₅ - 2,5-7,2 мг/дм³.

Проведен анализ десяти образцов воды, с использованием разработанных биосенсоров и стандартным методом разбавления. Пробы представляли собой образцы речной и болотной воды, сточные воды городских очистных сооружений, талые воды. Статистическая обработка полученных данных показывает, что результаты анализа стандартным методом разбавления и методом с использованием биосенсоров незначимо различаются между собой.

Разработанный бимедиаторный БПК-биосенсор уступает только по величине нижней границы определяемых концентраций биосенсору на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в гель химически-модифицированного ПВС (Arlyapov, 2013). Однако при анализе большинства реальных образцов данное значение нижней границы является приемлемым, кроме того при данном типе детекции существенно снижен рабочий потенциал (с 700 мВ кислородный электрод до 250 мВ модифицированный ферроценом углеродопастовый электрод), что позволяет снизить риск протекания побочных реакций с участием электроактивных примесей.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», соглашение № 14.574.21.0062 и РФФИ (грант 13-03-97514_p_центр_a).

Список литературы:

1. V.A. Arlyapov, N.Yu. Yudina, L.D.Asulyan, S.V. Alferov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone: Enzyme and Microbial Technology, 2013, p.257-262.

Взаимодействие регулятора *LysR*-типа *SgpR* с промотором

оперона деградации салицилата *sgpAIKGHB*

Филатова И.Ю.^{1,2}, Музафаров Е.Н.², Захарова М.В.¹

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

У бактерий контроль регуляции генов деградации салицилата осуществляют белковые транскрипционные факторы LysR-семейства [Tropel and van der Meer, 2004]. LysR-семейство транскрипционных регуляторов (LTTR) является наиболее распространенным типом регуляторных белков в царстве бактерий [Maddocks and Ouston, 2008]. Представители этого семейства контролируют экспрессию большого количества разнообразных генов, в том числе тех, которые связаны с вирулентностью [Matthias et. al, 2014], процессами метаболизма [Porrúa et. al, 2013], участвуют в регуляции типа «quorum sensing» [O'Grady et. al, 2011]. LTTR являются, в основном, активаторами транскрипции целевого оперона в присутствии малой молекулы – индуктора.

Белок SgpR, штамма *P.putida* AK5, относится к указанному семейству транскрипционных регуляторов [Т. Yu. Izmalkova, 2013]. Под его контролем находится путь минерализации салицилата до интермедиатов цикла Кребса через образование гентизата. В данной работе впервые охарактеризовали взаимодействие транскрипционного активатора LysR-типа SgpR с промотором оперона деградации салицилата *sgpAIKGHB* и установили значительное изменение уровня экспрессии генов *sgp*-оперона в присутствии индуктора.

Ранее нами было показано, что белок SgpR образует с P_{sgp} -оперон один тип комплекса, взаимодействует с P_{sgp} -оперон в виде тетрамера, как типичный представитель LTTRs. Методом задержки в геле (EMSA) экспериментально показано, что ТФ SgpR обладает высокой степенью сродства к P_{sgp} -оперон.

В представленной работе K_d определена методом анизотропии флуоресценции. Значимой разницы K_d в отсутствии/присутствии индуктора не отмечено. В отсутствии/присутствии индуктора K_d составила $\sim 6,45 \cdot 10^{-9} M$ и $\sim 3,1 \cdot 10^{-9} M$, соответственно. Методом DNase I футпринтинга был определен участок ДНК, который экранируется белком SgpR от действия ДНКазы I. SgpR защищает P_{sgp} -оперон на участках от -75 до -50 и от -43 до -24 п.н. по верхней цепи, от -83 до -56, от -50 до -45, от -41 до -26 по нижней цепи (рис.1).

Можно отметить, что участок расположенный ближе к *sgpR* гораздо лучше защищен, в сравнении с участком расположенным ближе к *sgpAIKGHB*. Подобный результат указывает на наличие высокоаффинного сайта в районе выше -35 элемента промотора *sgp*-оперона, что соответствует сайту узнавания RBS (recognition binding site), и низкоаффинного сайта, перекрывающегося с -35 элементом промотора *sgp*-оперона, что соответствует сайту активации ABS (activation binding site). На верхней цепи ДНК наблюдается гиперчувствительный участок, который свидетельствует об изгибании цепи ДНК в присутствии транскрипционного регулятора. Обнаруженный сайт RBS представляет собой вырожденный палиндром GATATNA-N₇-TNATATC протяженностью 21 п.н. с центральной позицией около – 67 п.н., содержащий консенсусный для LTTR мотив T-N₁₁-A. В области низкоаффинного сайта ABS консенсусного мотива обнаружено не было, что является типичным для представителей LTTR. Точка начала транскрипции генов оперона была определена методом амплификации 5'- концевых фрагментов кДНК

(5'-RACE). Стоит отметить, что -35 области промоторов регуляторного гена и оперона *sgpA* перекрываются.

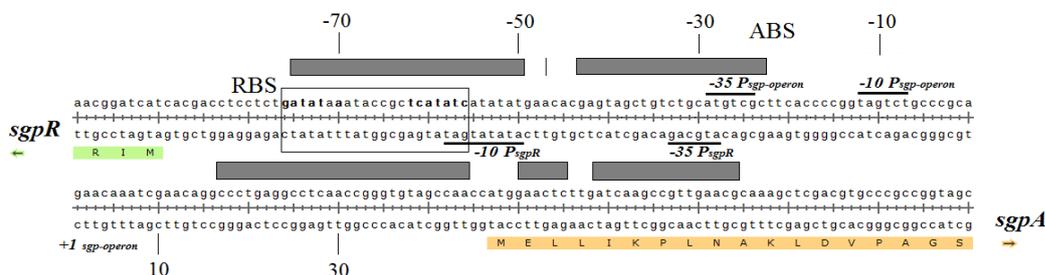


Рис.1. Предполагаемые сайты связывания RBS и ABS (выделены рамкой). Участки связывания белка с промоторной областью *sgp*-оперона выделены прямоугольником с серой заливкой. Гиперчувствительный участок обозначен горизонтальной полосой. Совпадающие нуклеотиды палиндрома выделены жирным шрифтом. -10 и -35 элементы промоторов регуляторного гена и *sgp*-оперона подчеркнуты

Обнаружено, что в отсутствие сайта ABS комплексообразование по-прежнему происходило, в то время как делеция сайта RBS приводила к нарушению взаимодействия транскрипционного регулятора с P_{sgp} -оперон (рис. 2). Это указывает на ключевую роль сайта RBS в связывании с белком SgpR.

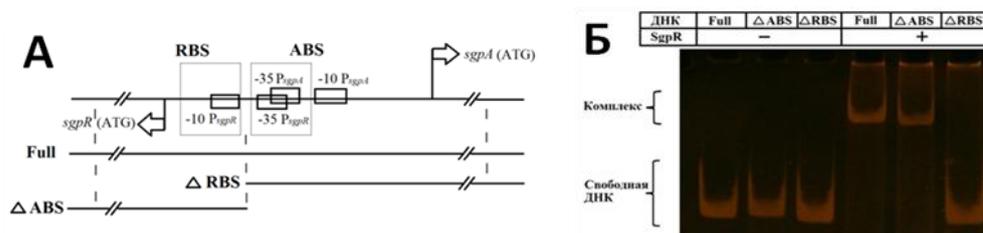


Рис. 2. А) Схематическое изображение промоторной области между регуляторным геном *sgpR* и целевым *sgp*-опероном. Б) Изменение электрофоретической подвижности фрагмента ДНК при связывании с белком SgpR

Сайт узнавания RBS перекрывается с -10 областью промотора регуляторного гена, что свидетельствует о наличии негативной авторегуляции собственного синтеза.

Количественный анализ изменения содержания мРНК гена *sgpR* и оперона *sgpA* проводили методом ПЦР в реальном времени. В качестве контрольного гена выбран ген 16S рРНК (рис. 3).

Уровень экспрессии регуляторного гена остается постоянным независимо от присутствия салицилата (Ср 19,1 и 19,5). Уровень экспрессии генов *sgp*-оперона в присутствии салицилата значительно возрастает (в $\sim 10^3$ раз; Ср 14,8 и 24,3).

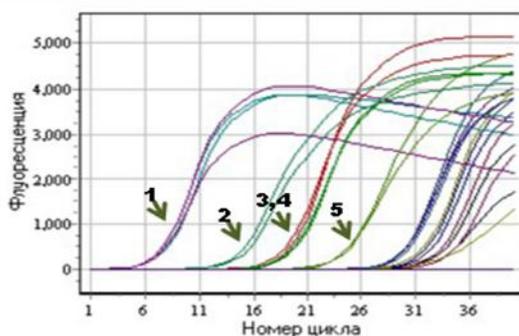


Рис. 3. Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла. 1- 16S рРНК, 2 – *sgpA*KGHV в присутствии индуктора, 3,4 – *sgpR* в присутствии/отсутствии индуктора, 5 - *sgpA*KGHV в отсутствии индуктора. Эксперимент проведен в трех биологических повторностях.

Определение лимитирующей стадии реакции окисления органических субстратов бактериями *Gluconobacter Oxydans*, иммобилизованными в гидрогель модифицированного поливинилового спирта

Асулян Л.Д., Гавриков А.С., Камаева О.А.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Проблема мониторинга содержания органических соединений в водных средах относится к важным практическим задачам. Значительная их часть может быть решена с помощью биосенсоров - устройств, использующих биологические материалы для «узнавания» определенных молекул и выдающих информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

В качестве биологического материала могут быть использованы как ферменты, так и целые клетки микроорганизмов. Основой для использования целых клеток в рецепторных элементах сенсоров являются содержащиеся в них наборы ферментов. При разработке ферментных электродов важно идентифицировать скоростьопределяющую стадию, от которой зависит эффективность работы всего прибора. Такой стадией может быть перенос субстрата через мембрану, реакция его с ферментом, перенос продукта реакции обратно через мембрану или регенерация фермента. Преобразования кинетических зависимостей сенсоров позволяют определить скоростьопределяющую стадию и константы Михаэлиса для ферментативного электрода.

Хотя оболочка бактерий и тем более плазматическая мембрана клеток многоклеточных организмов представляют собой лишь тонкий слой, мембраны, тем не менее, служат препятствием для молекул определяемых органических субстратов. Это оказывает влияние на скоростьопределяющую стадию, так как дополнительно появляется еще одна стадия - перенос субстрата через клеточную мембрану. Для закрепления микроорганизмов на поверхности электрода используют иммобилизацию в полимерные гели, которые создают дополнительные препятствия для проникновения субстрата к активному центру фермента.

Целью настоящей работы явилось определение лимитирующей стадии реакции окисления глюкозы клетками *Gluconobacter Oxydans*, иммобилизованными в гидрогель

ПВС, модифицированный УФ-облучением раствора полимера. Для определения скоростьопределяющей стадии строят градуировочную зависимость ответа биосенсора от концентрации субстрата, из которой получают необходимые для расчета параметры.

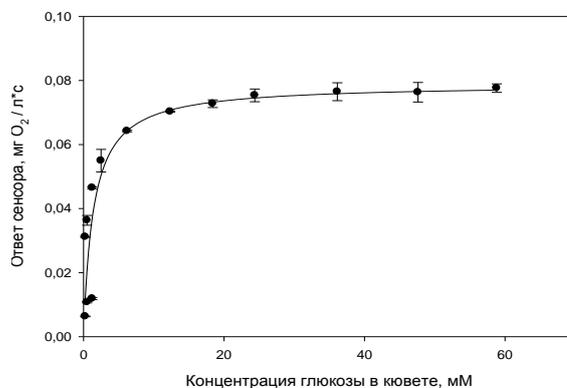


Рис. Зависимость ответа биосенсора от концентрации глюкозы в кювете

Таблица

Результаты обработки зависимости ответа биосенсора от концентрации глюкозы

Субстрат	Максимальная скорость V_{max} , мг/л*с	Эффективная константа Михаэлиса K_M , мМ	Коэффициент корреляции R^2
глюкоза	$0,079 \pm 0,006$	$1,4 \pm 0,4$	0,9853

По параметрам, приведенным в таблице, можно выявить лимитирующие стадии процессов, протекающих на ферментных электродах, используется подход, разработанный Элбери У. Дж. и Бартлетом П. Н., в котором биоэлектродокаталитическое окисление субстрата на электроде представляют в виде модели, учитывающей различные стадии: перенос субстрата через электродную мембрану к ферментным системам бактериальных клеток, реакцию его с ферментом.

Согласно известной методике получен график зависимости y от p во всем диапазоне измеряемых концентраций (59 – 0,5 Мм)

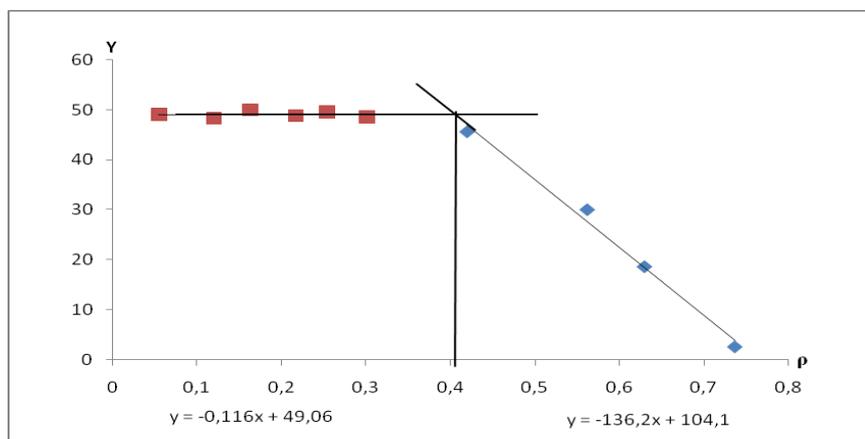


Рис. Зависимость y от p во всем диапазоне измеряемых концентраций (59 – 0,5 Мм)

Из графика зависимости y от p можно сделать вывод, что в диапазоне концентраций глюкозы 0,5 – 12,4 Мм скорость процессов, протекающих в биосенсоре лимитирует диффузия субстрата через мембрану к активным центрам ферментов.

В диапазоне концентраций 12,4– 58,8 Мм для биосенсора зависимость y от p носит характер прямой, параллельной оси абсцисс, следовательно, скорость процессов, протекающих в биосенсоре лимитируют не достигшая предела скорости ферментативные реакции

Таким образом, показано, что при низких концентрациях скорость окисления субстрата бактериями *Gluconobacter Oxydans* определяется, в основном, диффузией молекул определяемого компонента через мембрану к активным центрам ферментов, а при высоких концентрациях скорость реакции окисления определяется ферментативными процессами т.к активные центры ферментов связаны с субстратом.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014-2020 годы» соглашение № 14.574.21.0062.

Биосенсоры для определения глюкозы на основе печатных электродов, модифицированных медиаторами и углеродными наноматериалами

Скворцова Л.С., Каманин С.С., Арляпов В.А.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

Амперометрическое ферментативное определение веществ с применением печатных электродов является востребованной технологией в биосенсорике. Печатные электроды получают все большее распространение в качестве преобразователя сигнала биосенсора, поскольку отличаются компактностью, многофункциональностью, невысокой себестоимостью и являются отличной площадкой для модификации различным биологическим материалом. Для улучшения характеристик биосенсора используются медиаторы электронного транспорта, среди которых часто применяют Берлинскую лазурь и ферроцен, и различные графитовые материалы. Интерес к последним обусловлен высокой удельной площадью поверхности, увеличивающей площадь контакта биологического материала с анализируемым веществом, их электропроводностью и хорошей биосовместимостью. Это позволяет получать датчики с высокой чувствительностью и стабильностью ответов.

Целью работы является разработка и определение характеристик биосенсоров на основе печатных электродов, модифицированных углеродными нанотрубками для контроля содержания глюкозы. Для этого на поверхность рабочего электрода наносили медиаторы: в одном случае - Берлинскую лазурь, в другом – ферроцен. Затем наносили суспензию одностенных углеродных нанотрубок. После на слой нанотрубок наносили фермент глюкозооксидазу, иммобилизованный путем поперечной шивки глутаровым альдегидом в гидрогель бычьего сывороточного альбумина. Измерения проводили с применением потенциостата PalmSens EmStat.

В результате проделанной работы получена серия электродов для ферментативного определения глюкозы с использованием фермента глюкозооксидазы и различными модификациями медиаторов и углеродных наноматериалов: Берлинская лазурь;

Берлинская лазурь + терморасширенный графит; Берлинская лазурь + углеродные нанотрубки; ферроцен; ферроцен + терморасширенный графит; ферроцен + углеродные нанотрубки; углеродные нанотрубки. Сравнение характеристик разработанных электродов приведено в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительные характеристики разработанных модифицированных электродов (субстрат – раствор глюкозы 0,1 моль/дм³)

Электрод	1	2	3	4	5	6	7
Относительное стандартное отклонение (n=15), %	1,6	2,6	1,1	2,2	2,1	1,8	0,9
Длительность одиночного измерения, мин	1-2						
Коэффициент чувствительности, нА·дм ³ /ммоль	280±20	84±8	310±20	114±20	240±10	620±50	1500±40
Нижняя граница определяемых содержаний глюкозы, ммоль/дм ³	0,37	0,99	0,49	0,74	0,87	0,87	0,15
Верхняя граница определяемых содержаний глюкозы, ммоль/дм ³	1,7±0,1	4,4±0,6	1,7±0,1	2,5±0,3	1,8±0,1	1,48±0,02	2,1±0,2
Стабильность при хранении, сут.	более 30 суток						

Модификация электрода: 1 – Берлинская лазурь; 2 – Берлинская лазурь + терморасширенный графит; 3 – Берлинская лазурь + углеродные нанотрубки; 4 – ферроцен; 5 – ферроцен + терморасширенный графит; 6 – ферроцен + углеродные нанотрубки; 7 – углеродные нанотрубки.

Операционная стабильность сенсоров находится на высоком уровне – 0,9-2,6%. Длительность единичного измерения составляет 1-2 мин, что позволяет максимально сократить время проведения анализа. Стабильность при хранении – не менее 30 суток. Показано, что модификация электродов терморасширенным графитом в сочетании с ферроценом приводит к ухудшению характеристик электрода: коэффициент чувствительности снижается с 280 до 84 нА·дм³/ммоль, значительно увеличивается нижняя и верхняя границы определяемых содержаний глюкозы с 0,37 до 0,99 ммоль/дм³ и с 1,7 до 4,4 ммоль/дм³ соответственно. Данная особенность может быть объяснена диффузионными ограничениями, возникающими при использовании терморасширенного графита совместно с Берлинской лазурью. В остальных случаях применение графитовых материалов приводит к улучшению чувствительности сенсоров, но и к небольшому повышению нижней границы определяемых содержаний. Модификация ферроцен-содержащих электродов терморасширенным графитом и углеродными нанотрубками

приводит также к снижению верхней границы определяемых содержаний глюкозы и существенному сокращению рабочего диапазона.

Наиболее перспективным является биосенсор, модифицированный углеродными нанотрубками без применения медиаторов: операционная стабильность составляет 0,9%, нижняя граница определяемых содержаний глюкозы - 0,15 ммоль/дм³, коэффициент чувствительности – 1500±40 нА·дм³/моль за счет увеличенной площади контакта биоматериала с субстратом (глюкозой) и отсутствии промежуточного звена при переносе электронов (III поколение биосенсоров).

С применением разработанных биосенсоров проведен анализ образцов винной продукции. В качестве референтного метода использовался капиллярный электрофорез. Значения, полученные с использованием разработанных электродов, и референтным методом анализа совпадают с учетом доверительных интервалов.

Печатные электроды, модифицированные углеродными наноматериалами в сочетании с методом иммобилизации фермента в гель бычьего сывороточного альбумина, позволяют получать биосенсоры с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками, которые могут применяться для определения содержания глюкозы в продуктах биотехнологических производств.

Работа выполнена в рамках Государственного Задания Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К.

Регулирование активности аборигенных и инокулированных микроорганизмов-деструкторов с помощью сорбентов и мелиорантов в ходе биоремедиации нефтезагрязненных почв

Васильева Г.К.^{1,2}, Стрижакова Е.Р.¹, Кондрашина В.С.¹, Зиннатишина Л.В.^{1,2}, Слюсаревский А.В.², Соколов А.П.³, Филонов А.Е.⁴

¹ Лаборатория физико-химии почв ИФХиБПП РАН

² Пушчинский государственный естественно-научный институт

³ Отдел Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ РАН

⁴ Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

В настоящее время углеводороды нефти являются приоритетными почвенными поллютантами, загрязнение которыми наблюдается в местах нефтедобычи, транспорта, переработки нефти, а также в местах интенсивного использования нефтепродуктов. В России эксплуатируются сотни тыс. км нефтепроводов - около 80% которых изношено. По официальным данным в стране ежегодно происходит около 14 тыс. нефтеразливов. В настоящее время выявлено около 800 тыс. га нефтезагрязненных земель, официально нуждающихся в очистке. Автотранспорт тоже вносит свою лепту – около 4 млн. тонн «отработки» ежегодно сливается в почву.

В связи с этим одной из важнейших задач современной микробиологии и почвоведения является разработка методов очистки и рекультивации нефтезагрязненных почв. Выбор между радикальным способом очистки путем сжигания и экологичным и экономичным способом – биологической очисткой не всегда делается в пользу последней. Причины ограниченного применения метода биоремедиации связаны с повышенной

токсичностью почв, неблагоприятными климатическими и физико-химическими условиями, возможностью миграции поллютантов в грунтовые и поверхностные воды.

В ИФХиБПП РАН около 30 лет ведутся исследования по разработке концепции сорбционно-биологической очистки, которая основана на использовании разнообразных сорбентов, способствующих решению данных проблем. В результате, разработана комплексная технология очистки почв от загрязнителей разных классов, которая основана на индивидуальном подходе к деградабельным, малодеградабельным и недеградабельным поллютантам.

Углеводород-утилизирующие микроорганизмы (преимущественно бактерии) распространены во многих почвах, и в случае загрязнения углеводородами нефти при определенных условиях (температура 10-35°C, достаточная увлажненность почвы, pH в интервале 5,5-7,5, аэробные условия, наличие необходимых биогенных элементов, главным образом азота, фосфора и калия и микроэлементов) начинается процесс самоочищения почв. Однако, при повышенной концентрации углеводородов, токсичной для микроорганизмов и растений, необходимо внесение сорбентов, которые наряду с агроприемами (рыхление, увлажнение и внесение раскислителей и минеральных удобрений) обеспечивают благоприятные условия для роста и размножения аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов и/или инокулированных штаммов, внесенных в виде биопрепарата.

В течение последних 8 лет проводятся многолетние эксперименты по разработке сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных почв. Лабораторные и микрополевые эксперименты проводятся на базе ИФХиБПП РАН с 3 типами почв (серая лесная, аллювиальная луговая и чернозем выщелоченный), загрязненными легкой и средней нефтью, отработанным моторным маслом и дизельным топливом в дозах 10-150 г/кг. При этом наряду с другими коммерческими биопрепаратами испытывался препарат МикроБак, разработанный в ИБФМ РАН.

Результаты исследований показали, что основные проблемы при биоремедиации нефтезагрязненных почв связаны с повышенной концентрацией углеводородов нефти в почве, которые обычно создаются при нефтеразливах (более 50 г/кг). При этом резко возрастает гидрофобность почв, а также их токсичность вследствие повышенных концентраций самих углеводородов (в основном легкой фракции), и в особенности промежуточных продуктов их микробного окисления. Вследствие повышенной водорастворимости окисленных производных углеводородов возрастает вероятность загрязнения поверхностных и грунтовых вод соединениями повышенной опасности.

Установлено, что все изученные сорбенты (минеральные: карбоксил, целит, каолинит, вермикулит, диатомит; органические: торф и древесные опилки и углеродистые: активированный уголь и биочар) положительно влияют на скорость биоремедиации нефтезагрязненных почв при оптимальной дозе сорбентов в пределах 0,2-2%. Это выражается как в ускоренном снижении остаточной концентрации углеводородов, так и в более быстром снижении фитотоксичности почв. Механизм действия сорбентов обусловлен их положительным влиянием на влагоемкость и гидрофильность нефтезагрязненных почв, повышением стресс-устойчивости растений и микроорганизмов, а также снижением фито- и биотоксичности почв в результате обратимой сорбции токсичных компонентов углеводородов и их метаболитов сорбентами. Все эти факторы создают более благоприятные условия для деятельности нефтедеструкторов. При повышенных дозах сорбентов, которые определяются индивидуально для каждого сорбента, эффект от их внесения снижается или даже

становится отрицательным. Это можно объяснить сдвигом рН почвы в неблагоприятную сторону или избыточной сорбцией питательных элементов и самих углеводов, что замедляет скорость их деградации. Тем не менее, при правильном подборе формы и дозы сорбентов можно существенно ускорить процесс биоремедиации нефтезагрязненных почв и одновременно минимизировать вымывание токсикантов в грунтовые и поверхностные воды, не создавая условий для существенной задержки скорости биodeградации поллютантов [1-3].

Одними из наиболее эффективных сорбентов, на наш взгляд, являются активированный уголь и его более дешевый аналог – биоуголь (biochar). Механизм действия активированного угля объясняется тем, что в результате обратимой сорбции концентрация токсичных химикатов в почвенном растворе снижается до уровня ниже критического. При этом оказано максимальное повышение численности микроорганизмов-нефтедеструкторов в почве в несколько раз превышает контрольный уровень в почве без сорбента. Этот факт, наряду с ускоренным разложением углеводов, свидетельствует о том, что сорбированные углем углеводороды остаются доступными микроорганизмам и постепенно разлагаются.

В условиях микрополевого эксперимента показано, что другие сорбенты, в частности цеолит, каолинит, вермикулит, диатомит, торф, также усиливали эффект от внесения биопрепарата МикроБак при биоремедиации нефтезагрязненной почвы, что объясняется, главным образом, снижением гидрофобности почвы, а следовательно улучшением физических и водно-физических характеристик почвы, что повышает доступность для микроорганизмов и растений воды и питательных элементов.

Таким образом, было показано, что сорбенты снижают токсичность и подвижность загрязнителей в почве, улучшают структуру почвы и ее водно-физические свойства. В результате повышается численность и активность аборигенных и/или инокулированных нефтедеструкторов, что способствует ускоренной биоремедиации нефтезагрязненных почв.

Список литературы:

1. Васильева Г.К. и др., *Российский химический журнал*, 2013, 57(1):79-104.
2. Semenyuk N.N. et al., *Microbiology*, 2014, 83(5):589–598.
3. Яценко В.С. и др., *Проблемы анализа риска*, 2014, 5:6-17.

**Роль токсин-антитоксиновых систем в персистообразовании
Mycobacterium smegmatis в условиях действия тетрациклина**

Замахеев М.В., Гончаренко А.В., Шумков М.С.

Лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН

Как известно, одной из основных проблем при лечении туберкулеза является резистентность возбудителя заболевания - *Mycobacterium tuberculosis* - к большинству известных антибактериальных препаратов. Существует два типа антибиотикорезистентности у бактерий: наследуемая (обусловлена наличием генов устойчивости к антибиотикам) и фенотипическая, которая носит ненаследуемый характер и, как правило, является следствием пребывания клеток в состоянии персистенции.

Ранее было показано, что в формировании состояния покоя микобактерий важную роль играют токсин-антитоксиновые (ТА) системы. В частности, это было доказано в отношении системы *varBC* на примере быстрорастущего непатогенного родственника возбудителя туберкулёза *Mycobacterium smegmatis*. Однако, имеются литературные данные, что токсин-антитоксиновые системы участвуют и в процессах, обуславливающих программируемую клеточную смерть. В связи с этим, возникает предположение, что в условиях стресса (в частности, под действием антибиотиков) токсин-антитоксиновые системы будут дополнительно стимулировать гибель клеток в культуре. Таким образом, целью работы стало изучение физиологических эффектов, вызываемых действием токсин-антитоксиновых систем в результате действия антибиотиков.

Опираясь на предыдущие исследования и литературные данные, была выдвинута гипотеза о том, что разные токсин-антитоксиновые модули могут отвечать за разные физиологические процессы. Так, например, ТА-система *varBC* участвует в формировании клетками состояния покоя, а ТА-локус *mazEF* – в процессах программируемой клеточной смерти в условиях действия антибиотика. Для проверки данной гипотезы были сконструированы штаммы *Mycobacterium smegmatis* с делециями одного ТА-локуса ($\Delta varBC$ или $\Delta mazEF$) и двух ТА-локусов ($\Delta varBC \Delta mazEF$). Указанные штаммы сравнивались со штаммом *M. smegmatis* дикого типа по способности к персистообразованию. Для этого вышеперечисленные штаммы *M. smegmatis* культивировались в 24-луночных планшетах при температуре 37°C при постоянном перемешивании в присутствии антибиотика тетрациклина, представленного в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл. Данные концентрации были выбраны неслучайно: концентрация 5 мкг/мл всего в 2 раза превышает минимальную концентрацию, при которой не наблюдается роста культуры *M. smegmatis*. Определение числа персистеров осуществлялось путем проведения высевов из лунок планшета на I, II и VII сутки на чашки с агаризованной средой LB и подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

На рисунках 1 и 2 представлены результаты подсчета числа персистеров в культурах, подвергшихся воздействию тетрациклина в концентрациях 5 и 20 мкг/мл соответственно. Как видно из графиков, разница в физиологических эффектах при разных концентрациях антибиотика больше количественная, чем качественная. В обоих случаях штамм $\Delta varBC$ продемонстрировал ускоренное и более значительное снижение числа КОЕ по сравнению с диким типом. Вероятно, это может быть объяснено тем, что делеция локуса *varBC* лишает клетки способности переходить в состояние покоя, в котором они могли бы перенести неблагоприятные условия. Для выявления покоящихся клеток одновременно с определением числа КОЕ исследуемые культуры были инокулированы в жидкую питательную среду LB с целью определения наиболее вероятного числа клеток (НВЧ) методом десятикратного титрования в планшетах. Результаты представлены на рисунке 3. Как видно по предварительным данным, для штамма $\Delta varBC$ сохраняется тенденция к снижению числа персистеров по сравнению с диким типом, что в целом подтверждает выдвинутую гипотезу. В дальнейшем в ходе работы планируется изучить физиологические эффекты, вызываемые другими антибактериальными препаратами, а также гиперэкспрессией компонентов изучаемых ТА-систем микобактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-04900 А.

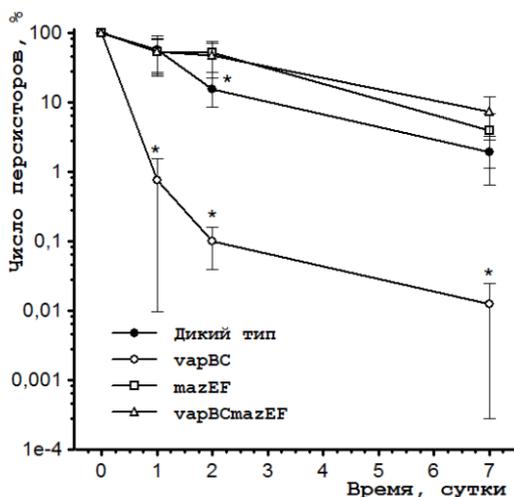


Рис. 1. Динамика изменения числа персистеров *M. smegmatis* под действием тетрациклина с концентрацией 5 мкг/мл

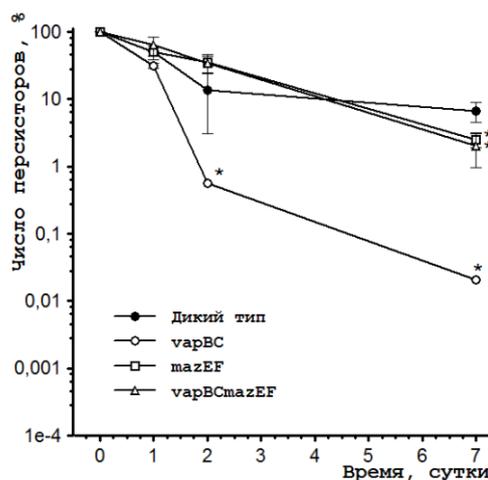


Рис. 2. Динамика изменения числа персистеров *M. smegmatis* под действием тетрациклина с концентрацией 20 мкг/мл

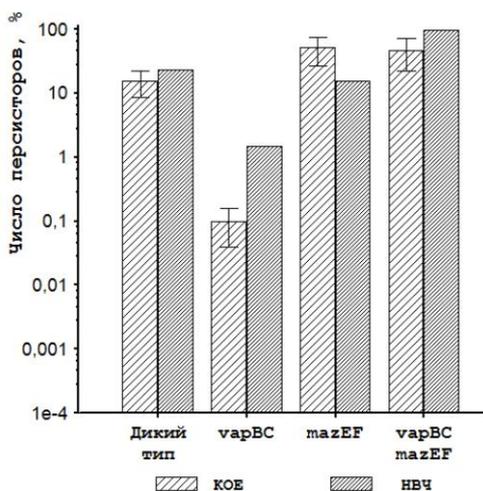


Рис. 3. Сравнение числа КОЕ и НВЧ на 2-е сутки культивирования с тетрациклином с концентрацией 5 мкг/мл

Транскрипционный профиль гриба *Pseudogymnoascus pannorum* ВКМ F-3808 при действии стрессоров

Тарлачков С.В, Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Стародумова И.П.,
Василенко О.В, Озерская С.М.

Отдел "Всероссийская коллекция микроорганизмов" ИБФМ РАН

Представители вида *Pseudogymnoascus pannorum* обладают психротолерантными свойствами, устойчивы к повышенным концентрациям соли [1] и способны переживать анаэробноз [2]. Это определяет актуальность изучения этих организмов в качестве модельных объектов при действии различных стрессоров. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов *P. pannorum* позволяет выявить функционально связанные гены

и определить основной адаптивный ответ клетки на неблагоприятные воздействия. Штамм *P. pannorum* ВКМ F-3808, выделенный в средней полосе России из почвенной подстилки с шерстью рыжей полевки европейской, является типичным представителем данного вида. Для этого гриба был определен полный геном [3], проведено полнотранскриптомное секвенирование в 2-х биологических повторностях для разных вариантов культивирования [4], в том числе, при действии стрессоров, что позволило оценить дифференциальную экспрессию генов.

Целью данной работы было проведение функционального анализа генов, изменивших свою экспрессию при действии как одиночных, так и сочетанных стрессоров (низкая температура, соль) по сравнению с контролем.

При анализе транскриптомов штамма *P. pannorum* ВКМ F-3808 установлено, что около 5000 генов изменили свою экспрессию при действии стрессоров более чем в 2 раза. Результаты показывают, что наиболее сильный транскрипционный ответ по числу задействованных генов наблюдался при холодовом стрессе, наиболее слабый – при солевом, и промежуточное значение наблюдалось при двойном стрессе (рис. 1).

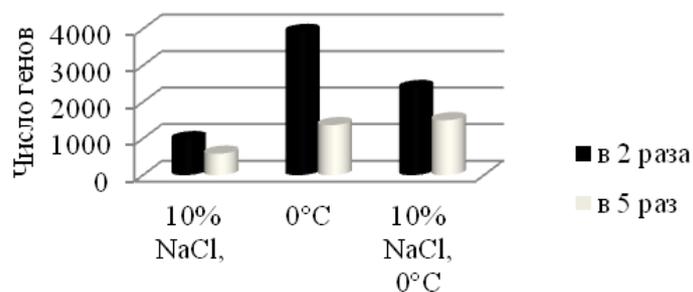


Рис. 1. Изменение экспрессии генов при действии стрессоров (более чем в 2 и 5 раз)

Однако на рисунке 1 видно, что только 35% генов из категории «изменившие экспрессию более чем вдвое» при действии холода, изменили ее более чем в 5 раз, в отличие от солевого стресса и сочетанного действия стрессоров, где число генов, изменивших экспрессию в 5 и более раз по сравнению с 2-х кратным изменением, было значительно выше (60 и 63% соответственно).

Для идентификации и аннотации трансмембранных транспортеров в процессе работы была создана оригинальная программа, которая использует Transporter Classification Database (www.tcdb.org) в качестве базы данных для поиска по гомологии. При всех видах стресса наблюдается повышение уровня экспрессии ряда ионных насосов при одновременном снижении экспрессии аквапоринов. Наблюдается увеличение транскрипции генов, ответственных за синтез жирных кислот и их десатурации, синтеза крио- и осмопротекторов (таких как инозитол, маннитол, пролин и глицин), происходит возрастание транскрипции генов с плохо охарактеризованной молекулярной функцией. При этом показано, что пути образования протекторов при действии разных стрессоров могут различаться. Установлено, что при действии низких температур образование пролина происходит из глутамата с участием фермента глутамат-5-киназы. Осмотический стресс активизировал путь катаболизма лизина через сахаропин, при котором также вырабатывается пролин.

В процессе холодового стресса увеличивается экспрессия генов биосинтеза стеролов, стабилизирующих клеточную мембрану, цикла трикарбоновых кислот, окислительного фосфорилирования и синтеза белков. Кроме того, выявлено, что при действии низких температур увеличивается экспрессия генов белков теплового шока (HSP), которые участвуют в процессах рефолдинга или элиминации денатурированных белков. Также при пониженных температурах возрастает экспрессия генов убиквитинов, играющих важную роль при деградации поврежденных и недостроенных белков. Показано, что при понижении температуры у штамма F-3808 происходит увеличение экспрессии генов убиквитин-лигазы и генов (около 20 генов), связанных с компонентами протеасом. Интересно, что в условиях холодового стресса у *P. pannorum* происходит увеличение транскрипции генов, связанных с клеточным циклом и репликацией ДНК, что ранее не упоминалось в научной литературе и будет предметом дальнейшего изучения.

При действии низких температур, кроме ожидаемых путей ответа клеток на стресс, упомянутых выше, активизируются и не совсем очевидные. Например, нами установлен факт увеличения экспрессии генов синтеза антимикробных веществ, а также генов сидерофоров, низкомолекулярных хелаторов, помогающих выжить грибам в условиях дефицита железа, в частности, в организме хозяина при патогенезе. Этот факт позволяет высказать предположение о связи потенциальной патогенности с высокой адаптивной способностью организма. Среди ответов, характерных только для двойного стресса, можно назвать повышение экспрессии генов гликолитического пути, что можно объяснить необходимостью клетки образовывать промежуточные метаболиты, необходимые для синтеза различных крио- и осмопротекторов.

Таким образом, в данной работе впервые изучен транскрипционный профиль мицелиального гриба *P. pannorum* при действии стрессоров – низкой температуры, высокой солености среды и их сочетания. В результате проведенного анализа были выявлены общие и частные типы реакции клеток на действие стрессоров. Обнаружен ряд известных ответов эукариотных организмов, а также показаны новые ранее не упоминавшиеся в литературе адаптационные механизмы.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-02082а и 15-29-02629-офи.

Список литературы

1. Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Акимов В.Н., Гиличинский Д.А., Озерская С.М. Галопсихротолерантные грибы рода *Geomyces* из криопэггов и морских отложений Арктики // Микробиология. 2007. Т. 76. № 1. С. 39–47.
2. Щербакова В.А., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Лауринавичюс К.С., Озерская С.М., Акименко В.К. Исследование роста грибов *Geomyces pannorum* в условиях анаэробноза // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 848–851.
3. Leushkin E.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Sutormin R.A., Gerasimov E.S., Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Vasilenko O.V., Kondrashov A.S., Ozerskaya S.M. Population genomics of *Pseudogymnoascus pannorum* reveals transmission of small genome fragments between lineages // BMC Genomics. 2015. V. 16 (5): 400. DOI 10.1186/s12864-015-1570-9.
4. Василенко О.В., Пенин А.А., Логачева М.Д., Герасимов Е.С., Клепикова А.В., Леушкин Е.В., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Озерская С.М. Анализ экспрессии генов у грибов-экстремофилов *Pseudogymnoascus pannorum* с использованием RNA-seq для изучения стратегий выживания в неблагоприятных условиях среды / Первая Пуштинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Пушкино: ИБФМ РАН. 2014. С. 132–134.

Влияние слабых магнитных полей на *Rhodospirillum rubrum* 2R

Хохлова Г.В.¹, Абашина Т.Н.², Вайнштейн М.Б.^{1,3}

¹ Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Пушчинский государственный естественно-научный институт

Электромагнитные поля, сопряженные с геомагнитным полем, носят общее название комбинированных магнитных полей (КМП). Известно, что КМП, в том числе включающие слабые низко-частотные поля, способны оказывать воздействия на живые организмы. Однако, опубликованные сведения о влиянии относятся к разным биологическим объектам, разрознены и предполагают различные возможные механизмы воздействия и разные эффекты. В частности, ряд исследователей предлагает применение таких полей для подавления бактерий.

Мы провели исследования на культуре фотосинтезирующих пурпурных бактерий *R. rubrum* 2R, любезно предоставленной Е.Н.Красильниковой (каф. микробиологии, МГУ им. М.В. Ломоносова). Культуру растили в модифицированной нами среде 27 DSMZ: модификация заключалась во внесении в среду нитратов (248 мг NO₃⁻/л), обеспечивающих возможность роста бактерий в темноте. Выращенную на свету культуру стерильно разливали по 12 мл в герметичные пробирки и помещали в 4 повторностях в темновых условиях в магнитные поля: КМП, настроенные на резонанс к фосфору (КМП-1: частота – 807 Гц, В_{АС} – 86,11 мкТл, В_{ДС} – 46,8 мкТл) и к железу (Fe III) (КМП-2: частота – 38,3 Гц, В_{АС} – 86,11 мкТл, В_{ДС} – 46,8 мкТл), а также в естественное геомагнитное поле (контроль). В каждом варианте по окончании опыта через 2 суток бактерий в пробирках фиксировали параформальдегидом (0,25 мл 40%) и помещали в холодильник.

По окончании эксперимента биомассу бактерий отделили центрифугированием (10000 g, 30 мин) и сравнили цитологические характеристики клеток (трансмиссионная электронная микроскопия срезов). В супернатанте после центрифугирования определили остаточные концентрации нитратов и фосфатов в растворе (ионная хроматография) и рассчитали их убыль.

Убыль фосфатов и нитратов в геомагнитном поле без наложенного электромагнитного была ниже, чем в каждом из вариантов КМП (Таблица 1). Потребление нитратов в ходе роста в темновых условиях связано с процессом нитратредукции, обеспечивавшей получение бактериями энергии. Убыль фосфатов в растворе, по-видимому, была обусловлена формированием нерастворимых соединений полифосфатов, формируемых в клетках, отделяемых при анализе раствора методами ионной хроматографии. Это предположение подтверждается обилием плотных неорганических внутриклеточных включений в условиях КМП (Рис. 1 а, б).

Следует отметить также возможность формирования магниточувствительных глобул клетками *R. rubrum* 2R. Ранее нами была показана способность образования таких включений другими представителями пурпурных бактерий, но для родоспирилл они показаны впервые (Рис. 1 в).

Убыль фосфатов и нитратов в культуре *R. rubrum* 2R в различных магнитных полях

Магнитное поле	Средняя величина (x)	Стандартная ошибка среднего значения (m)
Убыль в концентрации фосфатов в растворе, мМ		
Геомагнитное поле	0,29	0,16
КМП-1	0,52	0,01
КМП-2	0,64	0,03
Убыль в концентрации нитратов в растворе, мМ		
Геомагнитное поле	0,50	0,10
КМП-1	0,66	0,06
КМП-2	0,70	0,02

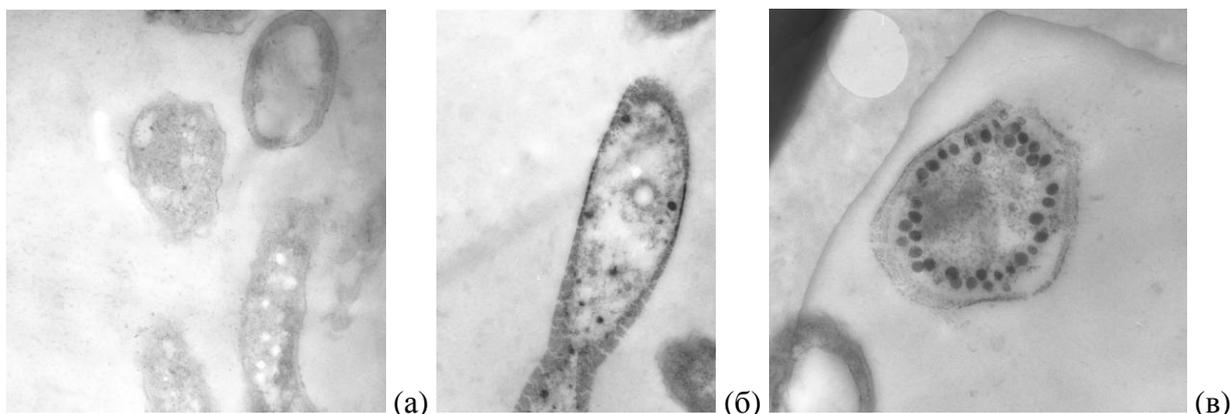


Рис. 1. Ультратонкие срезы бактериальных клеток в геомагнитном поле (а) и в поле КМП-2 (б, в). Темные объекты внутри клеток представлены неорганическими включениями, преобладающими в клетках в условиях КМП

Таким образом, слабые КМП стимулировали активность бактерий: трансформацию фосфатов и нитратов и формирование внутриклеточных неорганических включений.

Авторы выражают благодарность за предоставленную возможность проведения экспериментов в условиях КМП и предоставленную аппаратуру д.б.н. Н.А. Беловой и А.Б. Петрову (ИТЭБ РАН), а также к.б.н. Н.Е. Сузиной за консультации и А.Г. Быкову за измерения концентраций фосфатов и нитратов на ионном хроматографе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-03022-а «Магнитосомы и магнитные глобулы бактерий: образование в различных магнитных полях и с различными ферромагнетиками».

Влияние pH на рост гриба *Mortierella alpina* NRRL-A-10995 и синтез арахидоновой кислоты

**Степанова Н.Н.^{1,3}, Миронов А.А.³, Камзолова С.В.³,
Чистякова Т.И.², Дедюхина Э.Г.², Вайнштейн М.Б.^{1,2}**

¹ Пущинский государственный естественно-научный институт

² Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

Арахидоновая кислота (АК, 5, 8, 11, 14-цис-эйкозатетраеновая кислота) принадлежит к ω -6 группе незаменимых полиненасыщенных жирных кислот. В настоящее время АК широко используется в качестве добавки к детскому и спортивному питанию, а также находит применение в медицине, фармакологии, косметологии и сельском хозяйстве [1-4]. Возросший интерес к практическому использованию АК и ограниченность её содержания в природных источниках (печень и надпочечная железа животных, желток куриных яиц) делают необходимым развитие микробиологического производства. Ранее в лаборатории физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН были селекционированы перспективные штаммы-продуценты АК: *Mortierella alpina* LMP-301 и NRRL-A-10995 [5], показана их способность использовать глицерин в качестве дешевого и возобновляемого углеродного субстрата. Наименее изученным фактором, оказывающим влияние на липидогенез грибов, является кислотность среды. Имеются данные, что pH является фактором, регулирующим синтез АК у штамма *M. alpina* LPM 301 [6].

Цель работы – исследовать влияние pH среды на рост гриба *M. alpina* NRRL-A-10995 и синтез арахидоновой кислоты.

Исследование проводили в условиях периодического культивирования на глицерин-содержащей среде при температуре 24°C и начальном значении pH среды 6.0. На 4 сутки устанавливали различные значения pH в диапазоне от 3.0 до 8.0. Культивирование при заданных значениях pH продолжали до 14 суток. Пробы отбирали в период логарифмической и стационарной фаз роста культуры на 7 и 14 сутки соответственно. Биомассу определяли гравиметрическим методом. Липиды подвергали кислотному метанолизу; полученные метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном и анализировали на газо-жидкостном хроматографе Chrom-5.

Результаты:

Обнаружено, что pH среды оказывает различное влияние на рост штамма *M. alpina* NRRL-A-10995, образование липидов и синтез АК (рис. 1).

Наибольшая плотность биомассы (21–22 г/л) отмечена при pH 5.0–6.0. Накопление липидов было максимальным (16% от биомассы) при pH 7.0. Оптимальные значения pH для синтеза АК (19–20% от липидов) лежали в диапазоне 6.0–8.0. Полученные результаты позволяют рекомендовать приём двухфазного культивирования, который заключается в установлении pH на уровне 5.0 в начале культивирования (первые 7 суток роста культуры), что обеспечивает ускоренный рост биомассы, с дальнейшим подщелачиванием среды до pH 6.0–7.0 в стационарную фазу роста (7–14 суток) для максимального накопления АК в биомассе.

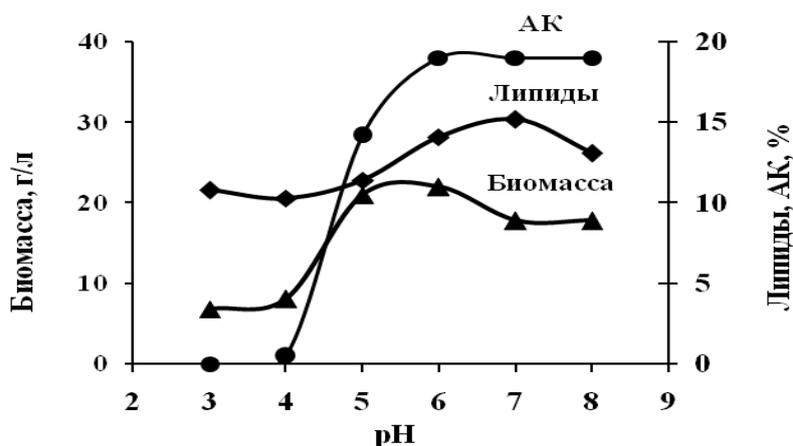


Рис. 1. Влияние pH на рост *M. alpina* NRRL-A-10995, синтез липидов и образование арахидоновой кислоты

Отмечено, что pH оказывает наиболее сильное влияние на синтез АК: снижение pH до 4.0–3.0 приводит к резкому уменьшению доли АК в липидах на 7 сутки (на 62–67%) и полному подавлению синтеза АК на 14 сутки (рис. 2).

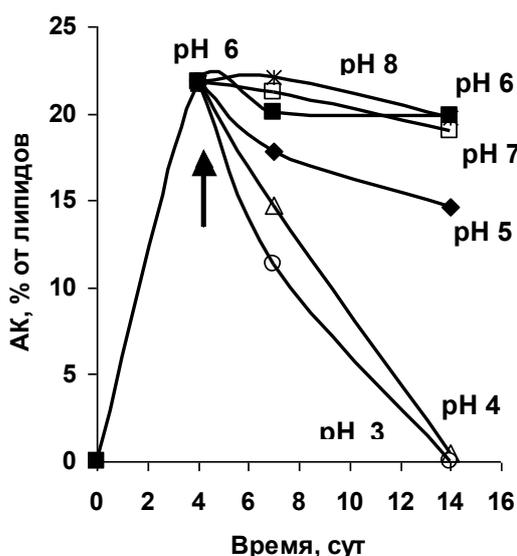


Рис. 2. Влияние изменения pH на синтез арахидоновой кислоты у штамма *M. alpina* NRRL-A-10995

Обнаружено, что снижение синтеза АК при низких значениях pH сопровождалось резким уменьшением отношения линолевой кислоты к олеиновой, которое характеризует активность Δ-12-десатуразы, ответственной за синтез линолевой кислоты. Таким образом, можно предположить, что при кислых значениях pH происходит ингибирование активности (или синтеза) Δ-12-десатуразы.

Полученные результаты о значительном влиянии pH на синтез АК у штамма *M. alpina* NRRL-A-10995 находятся в полном соответствии с ранее полученными данными для штамма *M. alpina* LMP-301 и, следовательно, вызванный изменением pH эффект носит

общий характер и не определяется индивидуальными особенностями отдельных штаммов–продуцентов АК.

Список литературы:

1. Dyal S. D., Narine S. S. // Food Res. Int. 2005. V. 38. P. 445-467.
2. Zhu M., Yu L. J., Wu Y. X. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 30. № 1. P. 75–79.
3. Ratledge C. // Biochimie. 2004. V. 86. P. 807-815.
4. Ward O., Singh A. // Process Biochem. 2005. V. 40. P. 3627-3652.
5. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 31-36.
6. Дедюхина Э. Г., Чистякова Т. И., Миронов А. А., Камзолова С. В., Минкевич И. Г., Вайнштейн М. Б. // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 243-250.

**Влияние природы лимитирующих рост компонентов на синтез
арахидоновой кислоты *Mortierella alpina***

***Дедюхина Э.Г.¹, Чистякова Т.И.¹, Миронов А.А.²,
Камзолова С.В.², Вайнштейн М.Б.^{1,3}***

¹Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

²Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

³Пуштинский государственный естественно-научный институт

Арахидоновая кислота (АК, С₂₀:4, омега-6) благодаря своим уникальным биологическим свойствам широко используется в медицине, в составе компонентов диетпитания и питательных смесей для грудных детей, а также в сельском хозяйстве в качестве стимулятора иммунитета растений к фитопатогенам. Ограниченность природных источников АК (печень и надпочечная железа животных, желток куриных яиц) диктует необходимость развития ее микробиологического производства. Известно, что необходимым условием интенсивного синтеза липидов микроорганизмами является разобщение конструктивного и энергетического обменов путем лимитирования роста клеток питательными компонентами или ингибирования физическими факторами. Данные о влиянии природы лимитирующих рост компонентов на синтез арахидоновой кислоты в литературе отсутствуют.

Целью настоящей работы было исследование влияния лимитирующего рост компонента (азот или источник углерода и энергии) на синтез АК мицелиальными грибами *Mortierella alpina*.

Селекционированные ранее штаммы–продуценты АК *M. alpina* LPM 301 и NRRL-A-10995 [1, 2] выращивали в периодическом режиме на минеральной среде, содержащей в качестве источника азота нитрат калия (1.5 г/л) и различные концентрации глицерина (соотношение С/Н в среде изменяли в пределах от 32 до 262) при рН 6.0 и температуре 28°C в течение 14 суток. Жирнокислотный состав липидов анализировали методом газожидкостной хроматографии после предварительного кислотного метанолиза жирных кислот.

Установлено, что при соотношении С/Н в среде до 150 рост грибов был лимитирован недостатком углеродного субстрата. В этих условиях, при повышении концентрации глицерина в среде наблюдалось увеличение плотности биомассы; в среде

были обнаружены лишь следовые количества глицерина. При соотношении C/N 150 и выше рост грибов был лимитирован недостатком азота, и дальнейшее повышение концентрации глицерина не приводило к увеличению плотности биомассы; остаточная концентрация глицерина составляла 2.0–29.0 г/л.

В условиях лимита углеродного субстрата содержание липидов в биомассе было в 3–3.5 раза ниже, чем при лимите азота, что объясняется преимущественным синтезом функциональных липидов, входящих в состав клеточных мембран, тогда как при лимитировании роста недостатком азота происходит интенсивное накопление липидов, являющихся запасным источником углерода и энергии.

Обнаружено, что лимитирование роста грибов недостатком глицерина способствует интенсивному синтезу АК (до 65% от массы липидов), что в 1.5 раза превышает ее уровень при лимите азота. Это наблюдение подтверждает активную метаболическую роль АК в качестве компонента функциональных липидов.

Известно, что активность десатураз, ответственных за синтез ненасыщенных жирных кислот, может быть оценена по соотношению кислот, являющихся продуктом и субстратом фермента [3]. В частности, отношения кислот C_{18:1}/C₁₈ и АК/C_{18:2} характеризуют активности Δ⁹- и Δ⁵-десатураз соответственно. Как видно на рис. 1, интенсивный синтез АК в условиях лимита углеродного субстрата сопровождается повышением соотношений этих жирных кислот, что свидетельствует о значительном увеличении активностей ферментов, ответственных за синтез олеиновой и арахидоновой кислот, по сравнению с и

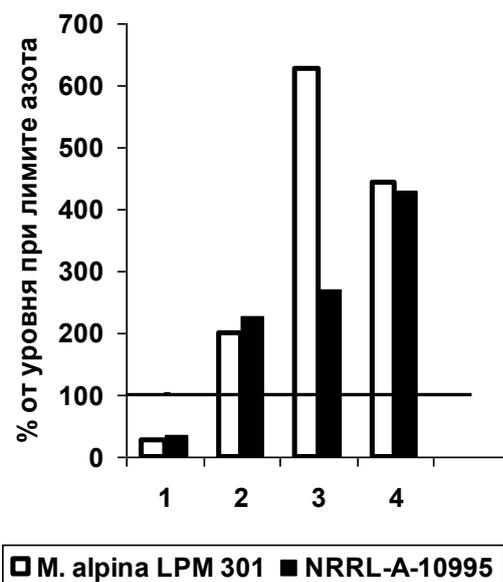


Рис. 1. Влияние лимитирования роста грибов глицерином на синтез липидов (1), арахидоновой кислоты (2) и соотношения кислот: c18:1/c18 (3) и ак/c18:2(4).

Данные представлены в процентах от их уровня при лимите азота

Таким образом, установлено, что недостаток углеродного субстрата способствует интенсивному синтезу АК у грибов *M. alpina*. На основании полученных результатов был предложен прием повышения доли АК в липидах грибов в 2–2.5 раза путем инкубирования мицелия *M. alpina* в условиях недостатка углеродного субстрата.

Список литературы:

- Eroshin V.K., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Zhelifonova V.P., Kurtzman C.P., Bothast R.J. //World J. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 12. P. 91–06.
Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I. //Process Biochem. 2000. V. 35. P. 1171–1175.
Fakas S., Makri A., Mavromati M., Tselepi M., Aggelis A. //Biores. Technol. 2009. V. 100. P. 6118–6120.

Стехиометрический синтез метаболических путей

Минкевич И.Г.

Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

Рассмотрены основы теоретического конструирования метаболических путей, превращающих заданные субстраты в желаемые продукты. Исходная информация для решения таких задач содержится в базах данных о биохимических реакциях. Алгоритм, синтезирующий метаболические пути, должен выбрать из такой базы необходимые реакции и определить потоки через них. Существующие в этой области публикации оставляют непроработанными ряд важных моментов в решении таких задач.

Известные уравнения баланса стационарных потоков имеют вид: $\sum_{r=1}^R v_{kr} z_r = b_k$ (k и r

- номера веществ и реакций, v_{kr} - стехиометрическая матрица, z_r - потоки через реакции, b_k - потоки обмена системы с внешней средой. Необходимо найти z_r при заданных b_k . Эта внешне простая задача осложнена двумя свойствами: 1) матрица v_{kr} не квадратная, 2) для необратимых реакций есть жесткие ограничения: $z_r \geq 0$.

Разработанный нами метод решения этой задачи содержит следующие этапы.

1) Приведение системы уравнений к виду, когда число уравнений меньше числа неизвестных. Этот этап включает обеспечение равенства ранга системы числу уравнений.

2) Разбиение матрицы полученной системы N на две: $N = (A \ C)$, где A - квадратная матрица полного ранга, и соответствующее разбиение вектора $\vec{z} = \begin{pmatrix} \vec{x} \\ \vec{y} \end{pmatrix}$.

3) Изучение ограничений на те компоненты \vec{y} и \vec{x} , которые соответствуют необратимым реакциям. Нами обнаружено, что среди плоскостей, соответствующих нулевым потокам через необратимые реакции, имеются семейства параллельных плоскостей. Это позволяет оставить только плоскости, соответствующие самому сильному ограничению в каждом из таких семейств. Кроме того, обнаружено, что существуют совокупности ограничений приводящие к фиксации значений некоторых из искоемых переменных и, как следствие, к уменьшению размерности пространства векторов \vec{y} .

4) Поиск линейно независимых векторов \vec{y} . Для каждого из них вычисляются векторы \vec{x} , используя матрицу A . Нулевые значения части компонент векторов \vec{x} и \vec{y} означают, что соответствующие реакции не участвуют в этих метаболических путях.

5) Вычисление величин b_k , соответствующие строкам исходной системы уравнений, временно отброшенным при выполнении этапа 1.

Использование этого подхода показало его эффективность. В качестве примеров приведены варианты метаболических путей образования янтарной кислоты из глюкозы и глицерина.

Новые экстремофильные бактерии, восстанавливающие железо и нитраты в низкотемпературных экосистемах

Захарюк А.Г.¹, Дамбинова Е.Ц.²

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

На сегодняшний день микробиологами описан полный биогенный цикл железа, осуществляемый микроорганизмами разных физиологических и филогенетических групп. Наиболее полно этот цикл изучен в условиях нейтральных значений рН и нормальных температур. Микроорганизмы, восстанавливающие железо при низких температурах, изучены недостаточно. Будучи компонентом двух важнейших макромолекул – белков и нуклеиновых кислот, азот, несомненно, является важнейшим элементом для существования жизни. Между тем, информация о физиологии и биохимии восстановления соединений азота и Fe(III) психрофильными микроорганизмами ограничена единичными сообщениями.

Целью нашего исследования было изучение биоразнообразия психрофильных и психроактивных нитрат- и железовосстанавливающих бактерий в донных осадках озера Байкал и холодных минеральных источниках Северного Прибайкалья, как пример экосистем с постоянной низкой положительной температурой.

В ходе работы нам впервые удалось получить из холодных глубинных осадков озера Байкал стабильные накопительные культуры бактерий, восстанавливающие соединения Fe(III) при температуре 5-20°C. Было показано, что полученные микробные сообщества железоредукторов проявляют наибольшую активность при температуре культивирования, близкой к природным условиям. Из проб придонного ила холодного минерального источника Буксыхен (Северное Прибайкалье) впервые были выделены восемь штаммов психрофильных и психроактивных железовосстанавливающих (ЖВБ) и нитратвосстанавливающих бактерий (НВБ). Все выделенные штаммы были проанализированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные результаты показали, что штаммы ЖВБ FePB-1 и B-G1-2 относятся к одному виду бактерий и вероятно отличаются только на штаммовом уровне. То же самое можно сказать и о штаммах FePB-4 и B-G1-3. Выделенный штамм B-G1-1 образует отдельную ветвь и принадлежит к новому виду или роду бактерий. Два новых денитрификатора НPB-2 и B-G1-5 также являются представителями одного вида или близкородственных видов. Штамм B-G1-4 представляет собой новый вид бактерий. На основании полученных данных нами были отобраны для дальнейших исследований три штамма ЖВБ (B-G1-1, B-G1-2 и B-G1-3) и два штамма НВБ (B-G1-4 и B-G1-5). Клетки выделенных штаммов ЖВБ представлены короткими тонкими подвижными палочками, не образующими споры. Для штаммов B-G1-1 и B-G1-2 максимальное количество Fe(II) зафиксировано при температуре инкубации 20

и 28°C, соответственно. Изолят В-Г1-3 проявлял наибольшую железовосстанавливающую активность при 7°C, что позволило отнести его к психрофильным микроорганизмам. Все выделенные микроорганизмы – алкалофилы с областью развития рН 7.5 – 9.5. Оптимум рН для штаммов В-Г1-1 и В-Г1-3 – 8.0; для штамма В-Г1-2 рН_{опт} 9.5. Филогенетический анализ показало, что два выделенных штамма (В-Г1-2 и В-Г1-3) относятся к семейству *Clostridiaceae*, а штамм В-Г1-1, является представителем семейства *Bacillaceae*. Наиболее близким к штамму В-Г1-1 оказался *Bacillus horikoshii* GN48^T (74% сходства). Сравнение последовательностей генов 16S рРНК штаммов В-Г1-2 и В-Г1-3 с депонированными в GenBank показало, что им наиболее близок *Clostridium* sp. Iso-A7^T (95 и 91% сходства, соответственно) - диссимиляционный железоредуктор, выделенный из пресной воды и способный восстанавливать различные формы железа

Новые штаммы НВБ отличались формой, цветом и размером колоний, а также морфологией клеток. Клетки штамма В-Г1-4 представлены мелкими подвижными неспорообразующими палочками. Клетки штамма В-Г1-5 имели бобовидную форму с центрально расположенной спорой. Оба штамма были психрофилами. Так, температурный оптимум роста штамма В-Г1-4 составил 4°C. Рост выше 10°C после двухнедельной инкубации не был зафиксирован. Температурный интервал развития штамма В-Г1-5 лежал в пределах 7 – 20°C с оптимумом роста при 10-15°C. Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК показал, что штамм В-Г1-4 является членом семейства *Pseudomonadaceae* в составе класса *Gammaproteobacteria* с ближайшим соседом психрофильной бактерией *Pseudomonas brenneri* ABI-446^T (97% сходства). Штамм В-Г1-5 является представителем семейства *Bacillaceae* с ближайшим соседом *Bacillus niacini* BN11^T (98% сходства).

Таким образом, проведенные исследования показали, что в холодных местах обитания с постоянно низкой положительной температурой активно функционирует микробное сообщество, восстанавливающее нитраты и железо (III). В ходе работы были выделены и охарактеризованы пять новых штаммов психрофильных и психроактивных нитрат- и железовосстанавливающих бактерий, отнесенных к семействам *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Clostridiaceae*.

Sphaerochaeta associata* sp. nov., новый вид кокковидных спирохет и распространение бактерий рода *Sphaerochaeta

**Трошина О.Ю.¹, Ошуркова В.И.¹, Сузина Н.Е.², Мачулин А.В.²,
Арискина Е.В.¹, Винокурова Н.Г.³, Щербакова В.А.¹**

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория микробной энзимологии ИБФМ РАН

Род *Sphaerochaeta* образует близкую ветвь с родом *Spirochaeta* в семействе *Spirochaetaceae*. До недавнего времени четыре изолята рода *Sphaerochaeta* были выделены и описаны: *Sphaerochaeta globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T (Ritalahti *et al.* 2012), *S. coccoides* SPN1^T (Dröge *et al.* 2006; Abt *et al.* 2012) и *S. multiformis* MO-SPC2^T (Miyazaki *et al.* 2014). Сферическая морфология и отсутствие характерной для спирохет подвижности отличает бактерии рода *Sphaerochaeta* от всех других представителей филума *Spirochaetes*.

Из культуры психротолерантной археи *Methanosarcina mazei* JL01 нами был выделен бактериальный штамм GLS2^T родственный по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с видами рода *Sphaerochaeta*. Выделенная бактерия-спутник находилась в тесной пространственной и метаболической ассоциации с метаносарциной, а именно, развивалась в псевдопаренхиме метаносарцин, росла в условиях и на среде оптимальной для археи и была устойчива к антибиотикам, используемым при культивировании метаногенных архей - ампициллину и стрептомицину. Цель данной работы – характеристика выделенной бактерии и анализ распространения в окружающей среде последовательностей 16S рРНК, высокоомологичных гену рРНК *Sphaerochaeta*.

Бактерии штамма GLS2^T неподвижны, сферической, овоидной и кольцевидной формы с диаметром 0,2-4 мкм. Они являются облигатными анаэробами, хемоорганогетеротрофами и используют в качестве источников углерода и энергии широкий спектр моно-, ди- и трисахаридов. Для роста также необходимы дрожжевой экстракт и витамины. Проявляют устойчивость к ряду β-лактамовых антибиотиков, а также стрептомицину, рифампицину и ванкомицину. В присутствии ампициллина клетки растут как стабильные L-формы на обычной среде без добавления осмопротекторов. Электронно-микроскопические фотографии этих форм показали клетки без клеточной стенки кокковидной, овоидной, неправильной формы и варьирующих размеров 0,1-2 мкм. На некоторых из клеток видны выросты мембраны, которые, по-видимому, в дальнейшем отпочковываются с образованием дочерних клеток. Оптимальные условия роста для изолята GLS2^T - 30-34°C, pH 6,8-7,5 и 1-2 г л⁻¹ NaCl. Основные жирные кислоты C₁₄:0, C₁₆:0, C₁₆:0 3-OH, C₁₆:0 ДМА, C₁₆:1n8 и and C₁₆:1 ДМА. Основные полярные липиды – фосфолипиды, фосфогликолипиды, гликолипиды. Ближайшими видами к GLS2^T по гомологии 16S рРНК являются *S.globosa* Buddy^T (99,3%) и *S.pleomorpha* Grapes^T (95,4%). Содержание ГЦ-пар в ДНК в новом штамме составило 47,2 мол.%. Уровень ДНК-ДНК гибридизации между GLS2^T и Buddy^T составил 34,7±8,8 %. На основе генетических, физиологических и биохимических тестов предложено выделить штамм GLS2^T как новый вид *Sphaerochaeta associata* с типовым штаммом GLS2^T (DSM 26261^T, VKM B-2742^T) (Troshina *et al.*, в печати)

Анализ рибосомальной базы данных Silva свидетельствует о широком распространении в природе и антропогенных средах последовательностей гомологичных генам 16S рРНК *Sphaerochaeta*. Они представлены в различных типах анаэробных реакторов и систем по переработке отходов, навоза, получения биогаза, в пресноводных и морских отложениях, в почве, в нефтяных месторождениях, в урановых и золотых шахтах. Большая группа последовательностей гомологичных 16S рРНК *Sphaerochaeta* представлена в желудочно-кишечном тракте разных животных, в том числе термита и млекопитающих.

Дальнейшие исследования и сравнение геномных и экспериментальных данных позволят понять причины и следствия тесного существования метаносарцины и сферохеты. Исследования L-форм сферохет имеют также фундаментальное и прикладное значение для медицинской микробиологии.

Список литературы:

1. Abt B *et al.* (2012) Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccoides* type strain (SPN1^T), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccoides* comb. nov. and emendations of the family *Spirochaetaceae* and the genus *Sphaerochaeta*. *Stand Genomic Sci* **6**, 194-209.

2. Dröge S *et al.* (2006) *Spirochaeta coccooides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl Env Microbiol* **72**: 392–397.
3. Miyazaki M *et al.* (2014) *Sphaerochaeta multiformis* sp. nov., an anaerobic, psychrophilic bacterium isolated from subseafloor sediment offshore Shimokita, Japan, and emended description of the genus *Sphaerochaeta*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64** (Pt 12):4147-54.
4. Ritalahti KM *et al.* (2012) *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *Int J SystEvolMicrobiol* **62**: 210-216.
5. Troshina O, Oshurkova V, Suzina N, Machulin A, Ariskina E, Vinokurova N, Kopitsyn D, Novikov A & Shcherbakova V (2015) *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015 Sep 3. doi: 10.1099/ijsem.0.000575. [Epub ahead of print].

Разнообразие и таксономия психрофильных протеолитических бактерий из холодных источников Северного Прибайкалья

**Чувильская Н.А.¹, Дамбинова Е.Ц.³, Рыжманова Я.В.¹,
Лауринавичюс К.С.², Щербакова В.А.¹**

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Микробные сообщества, функционирующие в условиях низких температур и минимального содержания органических веществ, являются практически единственной живой компонентой, осуществляющей процессы трансформации вещества и энергии в наземных холодных источниках.

Целью исследования являлось изучение разнообразия анаэробных психрофильных и психротрофных микроорганизмов в образцах осадков четырех холодных источников Буксыхен (Северное Прибайкалье, Республика Бурятия, Россия), характеризующихся температурой от 3,1 до 6,2°C, нейтральной или слабощелочной реакцией среды (pH 8,0-8,6) и окисленными условиями ($E_h +142$ - $+340$ мВ).

В ходе исследований из образцов были выделены 24 штамма анаэробных и факультативно анаэробных психрофильных и психроактивных протеолитических бактерий и изучены их некоторые физиолого-биохимические свойства. С помощью метода MALDI масс-спектрометрии целых клеток, полученные штаммы были разделены на 7 групп: 7 штаммов отнесены к виду *Janthinobacterium lividum*; 5 штаммов - к виду *Yersinia enterocolitica*; 4 штамма – к виду *Y. bercovieri*; 4 штамма - к виду *Y. aleksieciae* и по одному штамму к виду *Lactobacillus saerimneri*, *Bacillus funiculus* и *Achromobacter insolitus*.

Из каждой группы штаммов были отобраны по одному представителю и определены нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК. Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что 3 штамма (Vuc-zh-1; Vuc-p-16 и Vuc-ser-21) генетически отдалены от известных видов и, вероятно, представляют собой новые таксоны. Для этих трех штаммов были получены почти полные последовательности длиной 1398, 1411 и 1399 п.н., соответственно. Филогенетический анализ помощью базы данных GenBank и программы Blastn показал, что близкородственным видом для штамма Vuc-zh-1 является *J. lividum* со сходством 99.4%, штамму Vuc-p-16 родственен вид *Y. kristensenii* со сходством 99.1%. Филогенетический анализ последовательности гена 16S

pРНК штамма Vuc-ser-21 и близкородственного вида *Duganella zooglooides* (сходство 97.3%) показал, что выделенная нами бактерия представляет собой новый вид данного рода, широко распространенного в пресноводных экосистемах. Изучение физиолого-биохимических свойств показало, что бактерии этих трех штаммов являются грамотрицательными факультативно-анаэробными палочками. Температурный оптимум роста (а также температурный диапазон роста) был 29°C (7-42°C) для штамма Vuc-zh-1, 20°C (7-42°C) для штамма Vuc-p-16 и 7-10°C (7-20°C) для штамма Vuc-ser-21. Таким образом, штамм Vuc-zh-1 является психротолерантным мезофилом, штамм Vuc-p-16 – факультативный психрофил и Vuc-ser-21 – облигатный психрофил.

В результате работы также были получены чистые культуры психроактивных анаэробных гидролитических бактерий на казеине (18 штаммов), желатине (12 штаммов), сахарозой (10 штаммов) и Tween-80 (11 штаммов). Микроскопические исследования выявили в них палочки, отличающиеся размером, подвижностью и спорообразованием. Сравнение белковых профилей целых клеток показал, что среди выделенных культур доминируют представители родов *Pseudomonas*, *Raoultella* и вида *Serratia fonticola*, типичного обитателя пресноводных экосистем. Дальнейший анализ позволит охарактеризовать и определить таксономический статус выделенных бактерий.

Проведенные исследования показали, что в донных отложениях источника Буксыен обитают психрофильные и психротолерантные гидролитические микроорганизмы, которые метаболически активны при низкой температуре.

Впервые из 4 источников Буксыен выделены чистые культуры психротолерантных протеолитических факультативно-анаэробных бактерий родов *Janthinobacterium* и *Duganella*, по предварительным данным, представляющие новые виды этих родов.

Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации метаногенных архей: возможности и ограничения

Ошуркова В.И., Лауринавичюс К.С., Щербакова В.А.

Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

Актуальной проблемой современной микробиологии является поиск новых, более быстрых методов идентификации микроорганизмов, так как большинство используемых методов отличается большой продолжительностью или невысокой точностью.

В последние годы MALDI-TOF масс-спектрометрия зарекомендовала себя как простой и надежный метод идентификации микроорганизмов, в основе которого лежит анализ масс-спектра высоко консервативных и видоспецифичных рибосомальных белков. Степень сходства, выраженная в относительных единицах, позволяет сделать вывод о принадлежности микроорганизма к тому или иному виду. Однако важно отметить, что возможное ограничение предложенного метода связано с высоким сходством белкового профиля внутри некоторых групп микроорганизмов. Другим ограничением применения данного метода идентификации является отсутствие в коммерческих базах данных белковых профилей многих представителей эукариот и архей и, в частности, полное отсутствие данных о метаногенах.

Целью настоящей работы является оценка возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускоренной идентификации метанобразующих архей, выделенных из различных природных и техногенных экосистем.

В результате проведенного исследования впервые получены белковые профили более 40 штаммов метаногенов, относящихся к 24 видам родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanocalculus* и *Methanosaeta*.

Сравнение белковых профилей штаммов и построение дендрограмм позволило определить филогенетическое положение штаммов, для которых еще не были получены последовательности генов 16S рРНК. Так, например, штаммы *Methanosarcina* VKM-B2827 и *Methanosarcina* JL01 хоть и близки к типовому штамму *Methanosarcina mazei*, но, скорее всего, будут относиться к новому виду. Для палочковидных H₂-потребляющих метаногенов изучение белковых масс-спектров показало, что они уникальны, но существуют пики, характерные для родов *Methanobacterium* и *Methanospirillum*. Интересный результат был получен для *Methanobacterium thermoagregans* VKM B-1959^T и давно описанного типового штамма *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ДН^T. Сравнение белковых профилей выявило наличие пиков, отображающих одинаковые массы. Секвенирование гена 16S рРНК показало почти 100% сходство, что говорит о том, что эти микроорганизмы являются представителями 1 вида.

Таким образом, сравнение полученных данных с данными филогенетического анализа исследованных штаммов показало принципиальную возможность экспресс-определения новых представителей метанобразующих архей методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с точностью до вида.

Новые анаэробные бактерии, выделенные из криопэггов и содовых озер

Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.

Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

Сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) являются одной из наиболее биогеохимически значимых групп бактерий, играющих ведущую роль в анаэробном цикле серы. Если содовые озера имеют давнюю историю изучения и хорошо известны как места обитания галоалкалофильных сульфатредукторов и многих других метаболических групп микроорганизмов, то криопэги – незамерзающие линзы соленой воды в вечной мерзлоте – представляют собой малоисследованные экосистемы, перспективные для поиска новых, ранее неизвестных экстремофильных прокариот. В качестве объектов для выделения экстремофильных анаэробных бактерий были выбраны криопэги полуострова Ямал и донные осадки содово-соленых озер Южной Бурятии Соленое и Сульфатное.

Из арктического криопэга выделен психротолерантный галофильный сульфатредуктор, являющийся представителем нового вида '*Desulfovibrio algotolerans*' (K3S^T= VKM B-2877^T= DSM 100341^T) и способный расти при отрицательных температурах.

Из донных осадков содовых озер выделены и охарактеризованы 4 новых изолята галоалкалофильных анаэробных бактерий, относящихся к родам *Desulfonatrum* (штаммы Ki4, Ki5^T и Su2) и *Anoxynatronum* (Su22^T). Сульфатвосстанавливающая бактерия штамм Ki5^T (=VKM B-2477^T=DSM 26308^T) является представителем нового вида *Desulfonatrum buryatense*. Изоляты Ki4 и Su2 являются новыми штаммами известного

вида СВБ *Desulfonatronum lacustre*. При этом штаммы Ki5^T и Su2 являются первыми представителями алкалофильных сульфатредукторов содовых озер, способными использовать трехвалентное железо в качестве акцептора электронов. Протеолитическая бактерия штамм Su22^T представляет собой новый вид '*Anoxynatronum buryatense*' (=ВКМ В-2510^T=СЕСТ 8731^T) и характеризуется способностью к росту на клетках сульфатредуктора, выделенного из этого же места обитания, что определяет экофизиологическую роль нового вида как поставщика аминокислот, ацетата и формиата в трофическую цепь алкалофильных микробных сообществ содовых озер.

Таким образом, получены новые данные о видовом разнообразии и метаболическом потенциале анаэробных бактерий содовых озер и криопэгов, а также впервые показано участие СВБ содовых озер в процессе алкалофильной железоредукции.

Функционирование Pma1 H⁺-АТРаза дрожжей при изменении заряда: роль остатков Asp-739 и Arg-811

Петров В.В.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

H⁺-АТРаза плазматической мембраны грибов и дрожжей (Pma1), кодируемая геном *PMA1*, относится к широко распространенной и физиологически важной группе P2-АТРаз (1), в которую также входят H⁺-АТРаза плазматической мембраны растений и H⁺,K⁺-, Na⁺,K⁺- и Ca²⁺-АТРаза животных. Эти ферменты, являясь одновременно фосфогидролазами и ионными насосами, сопрягают энергию гидролиза АТФ с транспортом различных моно- и дивалентных катионов через клеточные и внутриклеточные мембраны (1). Pma1 H⁺-АТРаза является жизненно необходимым ферментом, создающим на плазматической мембране электрохимический градиент протонов, за счет которого функционируют различные вторичные транспортные системы, поддерживается ионный гомеостаз и внутриклеточный рН.



Рис. 1. Аминокислотные остатки в сегменте М6 Pma1 АТРаза дрожжей, важные для биогенеза и функционирования фермента. Остаток Asp-739 находится в цитозольной фазе под сегментом М8

В Pma1 H⁺-АТФазе дрожжей *S. cerevisiae* имеется консервативный остаток Asp-739 (рис. 1), находящийся на границе мембранного сегмента М6 и цитозоля, замена которого на Ala вызывала полное блокирование биогенеза фермента, не достигавшего секреторных везикул (2). Было предположено, что между этим остатком и находящимися рядом остатками с положительным зарядом может возникать сильная ионная связь с образованием солевого мостика, и замена D739A вызывала разрыв этой связи. В данном исследовании мы предположили, что таким стабилизирующим остатком мог быть консервативный остаток Arg-811 (рис. 2), расположенный в непосредственной близости от Asp-739. Для проверки предположения использовали мутанты с единичными (D739A, D739R, R811A и R811D) и двойными заменами, нейтрализующими заряды (D739A/R811A) или меняющими их полярность (D739R/R811D). Экспрессия АТФаз с точечными заменами R811A и R811D составляла 38-63%, а их активности – 29-30% от уровня дикого типа; гидролиз АТФ и транспорт H⁺ у этих ферментов были существенно разобщены. В случае остальных замен, включая двойные, биогенез фермента был практически блокирован. Представленные результаты являются дальнейшим продолжением изучения структурно-функциональной организации Pma1 H⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей и сфокусированы на остатках Asp-739 и Arg-811 с целью выяснения их роли и получения ответа на вопрос, не образуют ли данные остатки сильную ионную связь (солевой мостик), которая могла бы играть роль в поддержании структуры и функционирования фермента. Результаты подтверждают важную роль остатков Asp-739 и Arg-811 в биогенезе и функционировании фермента, однако исключают наличие солевого мостика между ними и/или значение такой связи для структурно-функциональной организации Pma1 H⁺-АТФазы.

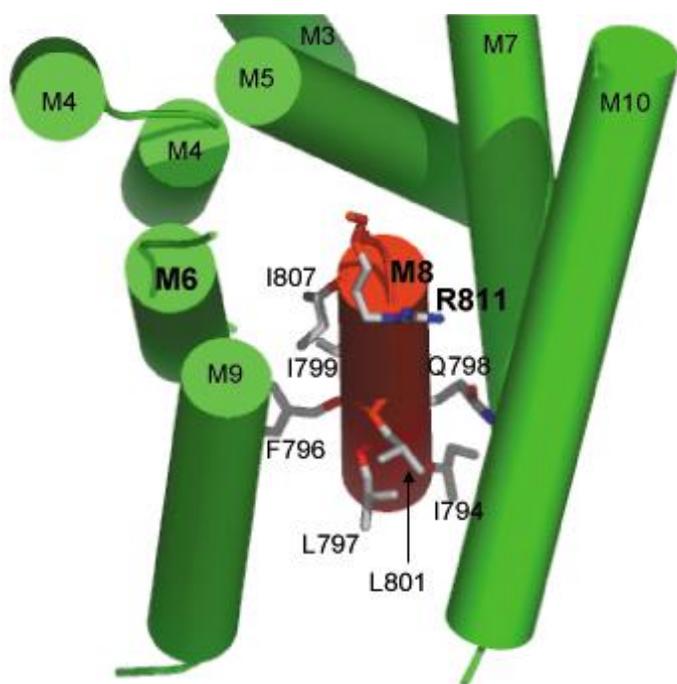


Рис. 2. Аминокислотные остатки в сегменте M8 Pma1 АТФазы дрожжей, важные для биогенеза и функционирования фермента. Остаток Arg-811, обращенный в цитозоль, выделен

Список литературы:

1. Lutsenko, S., and Kaplan, J. H. (1995) *Biochemistry*, 34, 15607-15613.
2. Miranda, M., Pardo, J.P., and Petrov, V.V. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 1781-1789.

**Влияние мутаций в регуляторном домене H⁺-АТФазы
плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
на метаболизм полифосфатов**

Томашевский А.А., Петров В.В.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

АТФаза плазматической мембраны дрожжей – жизненно важный фермент. Являясь протонной помпой, он создаёт градиент ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$), который используется для активного транспорта веществ в клетку по механизму вторичного транспорта. Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при добавлении глюкозы к клеткам происходит обратимое быстрое и значительное увеличение активности фермента, сопровождающееся изменением кинетических параметров; при этом происходит множественное фосфорилирование молекулы АТФазы: в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 аминокислотных остатков, из которых точно установлены только 3. Важным доменом этого фермента является С-концевой цитоплазматический участок молекулы. Показано, что регуляция активности H⁺-АТФазы дрожжей уровнем глюкозы связана с фосфорилированием остатков серина 911 и треонина 912 в этом домене [Lecchi et al., 2007]. Неорганические полифосфаты синтезируются в клетке с использованием АТФ и тесно связаны с энергетическим обменом дрожжей. Не исключено, что они могли бы участвовать в фосфорилировании ферментов. Однако сведения о связи их обмена с функционированием рассматриваемой АТФазы отсутствуют. Поэтому представляло интерес изучить взаимосвязь между функционированием H⁺-АТФазы плазматической мембраны и метаболизмом полифосфатов на примере нескольких мутантов, различающихся по возможности фосфорилирования некоторых аминокислотных остатков С-концевого домена.

Цель работы: Изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков серина 911 и треонина 912 H⁺-АТФазы плазматической мембраны на её активность, скорость роста и обмен полифосфатов.

В работе были использованы мутанты, АТФаза которых может и не может быть фосфорилирована по 911ому и 912ому остатку: S911A (серин 911 заменён на аланин), S911D (серин 911 заменён на аспарагиновую кислоту), T912D (треонин 912 заменён на аспарагиновую кислоту), S911D/T912A (серин 911 заменён на аспарагиновую кислоту и треонин 912 заменён на аланин) и родительский штамм NY13. Мутации не вызвали значительных нарушений активности АТФазы, однако привели к снижению скорости роста у штаммов S911D, T912D, S911D/T912A и уменьшению содержания АТФ у штаммов S911D и S911D/T912A. Это может свидетельствовать о наличии разобщения гидролиза АТФ и протон-транспортной активности, что было показано для одного из штаммов (T912D). Однако суммарное содержание полифосфатов не претерпело значительных изменений, что говорит о стабильности накопительной части пула полифосфатов как запаса фосфора и энергии. Наблюдается перераспределение содержания полифосфатов между фракциями и незначительное изменение длины их цепи, однако четкой корреляции этих изменений с изменениями в функционировании АТФазы выявить не удалось.

Таким образом запасание фосфата и энергии в виде накопительной части полифосфатов является весьма стабильным процессом и может не реагировать на снижение уровня АТФ

Для выявления того участвуют ли полифосфаты в фосфорилировании АТФазы нужны условия, при которых накопительная часть полифосфатов не синтезируется.

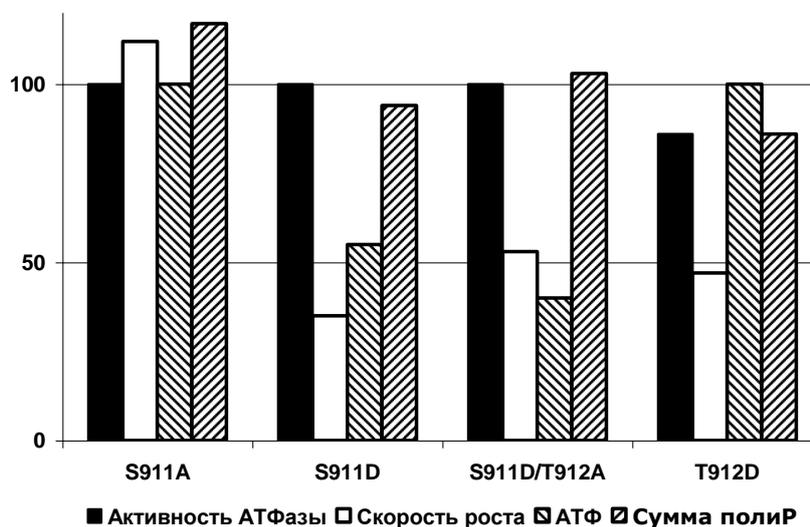


Рис. 1. Активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны, скорость роста на логарифмической стадии, содержание АТФ и суммарное содержание полифосфатов у родительского и мутантных штаммов в процентах от данных родительского штамма

Публикации по материалам исследования:

1. А.А. Tomashevski and V. V. Petrov Mutations in the yeast Pma1 H^+ -ATPase regulatory domain affect polyphosphate metabolism J.Biomol. Struct. Dyn. 2015, v. 33. p. 105.

Устойчивость дрожжей к ионам марганца: характеристики роста и клеточная морфология

Рязанова Л.П.¹, Звонарев А.Н.², Дмитриев В.В.², Кулаковская Т.В.¹

¹ Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

² ВНТК трехмерных структур микроорганизмов ИБФМ РАН

Изучение устойчивости микроорганизмов к тяжелым металлам важно для понимания механизмов преодоления стрессов связанных с изменениями окружающей среды.

Устойчивость к ионам марганца была исследована у представителей некоторых видов базидиомицетных (*Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus terricola*, *Cryptococcus curvatus*) и аскомицетных дрожжей (*Candida maltose*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kuraishia capsulata* Lindnera *fabianii*, *Saccharomyces cerevisiae*). Присутствие 2.5 mM Mn^{2+} в среде культивирования приводило к увеличению продолжительности лаг-фазы и уменьшению скорости роста в логарифмической фазе у всех изученных видов, однако задержка роста не повлияла на общую биомассу дрожжей (табл.1). Адаптация к Mn^{2+} вызывала изменения

в морфологии клеток. У аскомицетных дрожжей наблюдалось увеличение общего размера клеток и укрупнение вакуолей.

Таблица 1

Влияние ионов Mn^{2+} на характеристики роста различных видов дрожжей

Виды и штаммы	Характеристики роста, контроль / 2.5 mM Mn^{2+}		
	Продолжительность лаг-фазы, час	Скорость роста (μ) в логарифмической фазе, час ⁻¹	Вес сырой биомассы в стационарной стадии роста, г
<i>Cryptococcus humicola</i> VKM Y-2238	2.1 / 2.1	0.46 / 0.22	12.7 / 8.5
<i>Cryptococcus terricola</i> VKM Y-1598	8.1 / 8.2	0.14 / 0.09	3.0 / 3.0
<i>Cryptococcus curvatus</i> VKM Y- 2236	2.2 / 9.0	0.42 / 0.12	3.8 / 3.5
<i>Candida maltosa</i> VKM Y-1506	2.3 / 6.5	0.70 / 0.35	3.5 / 4.2
<i>Kluyveromyces marxianus</i> VKM Y-876	2.2 / 14	0.44 / 0.07	4.3 / 4.6
<i>Kuraishia capsulata</i> VKM Y-2514	2.2 / 2.5	0.41 / 0.18	3.0 / 3.5
<i>Lindnera fabianii</i> VKM Y-1450	1.3 / 3.5	0.54 / 0.18	3.4 / 3.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> VKM Y-1173	5.6 / 110	0.69 / 0.12	3.8 / 4.2

У *L. fabianii*, *K. capsulata*, *C. maltosa*, and *Cr. humicola* происходило накопление большого количества неорганических полифосфатов (табл. 2), сходное с тем, что обнаружено ранее у *S. cerevisiae* [1]. В то же время у *Cr. terricola* и *Cr. curvatus* такого накопления не наблюдалось (табл. 2). Для установления локализации в клетках *in vivo* полифосфатов, а также ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} применяли флуоресцентную микроскопию [2]. У всех изученных видов увеличивалось содержание полифосфатов в клеточной стенке (окраска DAPI).

Базидиомицетные дрожжи *Cr. humicola*, *Cr. curvatus* и *Cr. terricola* в присутствии Mn^{2+} накапливают Mg^{2+} в клеточных компартментах (окраска титановым желтым), у аскомицетных дрожжей такого накопления не наблюдали. Ионы Mg^{2+} конкурируют с ионами Mn^{2+} [3], и их накопление может быть фактором устойчивости к марганцу.

Вывод: У дрожжей относящихся к различным таксономическим группам существуют различные механизмы адаптации к токсическим концентрациям ионов Mn^{2+} . Эти механизмы включают компартментализацию Mn^{2+} в вакуолях, образование комплексов полиР с марганцем в клеточной стенке и снаружи от нее, а также накопление магния в клеточной стенке.

Таблица 2

Содержание марганца и полифосфатов (поли Р) в клетках дрожжей, выращенных до стационарной фазы в присутствии 2.5 mM Mn²⁺ (контрольные клетки /клетки выращенные в присутствии Mn²⁺)

Виды дрожжей	Mn ²⁺ , мкмоль/г сырой биомассы	Содержание поли Р, мкмоль Р / г сырой биомассы			Увеличение полиР в присутствии Mn ²⁺ (разы)
		Кислоторастворимые поли Р	Кислотонерастворимые поли Р	Суммарные поли Р	
<i>Cryptococcus humicola</i> VKM Y-2238	117 ± 5.2	39 ± 5.6 / 107 ± 2.1	138 ± 6.4 / 192 ± 5.7	177 / 299	1.69
<i>Cryptococcus terricola</i> VKM Y-1598	86.7 ± 2.5	133 ± 20 / 187 ± 23	507 ± 8.0 / 463 ± 53	640 / 650	1.01
<i>Cryptococcus curvatus</i> VKM Y-2236	84.0 ± 2.7	91 ± 6.8 / 106 ± 12	197 ± 10 / 197 ± 15	288 / 303	1.05
<i>Candida maltosa</i> VKM Y-1506	145 ± 0.4	40 ± 0.9 / 147 ± 1.4	294 ± 5.5 / 350 ± 19	334 / 497	1.48
<i>Kluyveromyces marxianus</i> VKM Y-876	186 ± 7.2	142 ± 3.9 / 155 ± 6.5	64.7 ± 1.3 / 104 ± 1.9	207 / 259	1.25
<i>Kuraishia capsulata</i> VKM Y-2514	86.2 ± 4.2	21.5 ± 1.3 / 56 ± 7.7	129 ± 3.0 / 223 ± 13	151 / 279	1.90
<i>Lindnera fabianii</i> VKM Y-1450	133 ± 4.5	60 ± 11 / 350 ± 12	184 ± 9.7 / 276 ± 13	244 / 626	2.57

Список литературы:

1. Andreeva N.A. et. al. FEMS Yeast Res 2013,13: 463–470.
2. Личко Л.П., Огороков Л.А. Докл. Акад. Наук. СССР 1976, 227, 756–758.
3. Blackwell KJ, Tobin JM, Avery SV Appl Microbiol Biotechnol.1998, 49,6,751-757.

Рекомбинантная полифосфатаза PPX1 для анализа полифосфатов

Личко Л.П., Кулаковская Т.В.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

Неорганические полифосфаты являются важными регуляторами метаболизма и используются в пищевой промышленности, поэтому разработка методов быстрого и высокочувствительного анализа их содержания в биологических образцах и пищевых продуктах является актуальной задачей. Энзиматический метод является эффективным

подходом для ее решения. Для разработки такого метода необходимо иметь возможность относительно дешевого получения специфических полифосфатаз с большим выходом. В совместной работе с Центром Биоинженерии РАН был получен штамм-сверхпродуцент экзополифосфатазы PPX1 *Saccharomyces cerevisiae* (Личко и др. Биохимия 2014, т. 79 с. 1487-1492).

Цель работы: очистка и характеристика рекомбинантной экзополифосфатазы PPX1 и изучение возможности использования ее для анализа полифосфатов. Рекомбинантная экзополифосфатаза PPX1 с удельной активностью ~300 Е/мг белка и высоким выходом (40 Е/ г биомассы) была очищена из штамма-сверхпродуцента. По субстратной специфичности и потребности в катионах двухвалентных металлов очищенная рекомбинантная PPX1 идентична ферменту дикого типа. Препарат пригоден для определения полифосфатов в присутствии ортофосфата, пирофосфата и нуклеозидфосфатов, которые он не гидролизует.

Полученный препарат PPX1 успешно использован для энзиматического определения полифосфатов в экстрактах биомассы нескольких видов дрожжей (Табл.1) и пищевых продуктов (Табл. 2). Методика предусматривает определение ортофосфата до и после обработки ферментом. Для сравнения в таблицах приводятся данные о содержании лабильного фосфора, определяемого как ортофосфат после обработки образцов 1 н соляной кислотой при кипячении. Полученные данные показывают, что энзиматическое определение более специфично, поскольку пирофосфат, обычно присутствующий в пищевых продуктах в значительном количестве, определяется как лабильный фосфор. Для получения количества фермента, позволяющего сделать свыше 1000 анализов, достаточно 1 г биомассы штамма-сверхпродуцента.

Таблица 1

P_i, лабильный фосфор и энзиматически определенные полифосфаты
в различных видах дрожжей

Вид дрожжей	Фосфорные соединения, мкмоль/г сырой биомассы				
	P _i	Кислоторастворимая фракция		Кислотонерастворимая фракция	
		Лабильный фосфор	Энзиматически определенные полифосфаты	Лабильный фосфор	Энзиматически определенные полифосфаты
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.6 ± 0.7	15.2 ± 0.3	7.3 ± 0.5	36.0±0.7	36.0 ± 0.5
<i>Lindnera fabianii</i>	6.0 ± 1.0	4.3 ± 0.2	2.5 ± 0.5	16.0±2.6	15.1±3.0
<i>Cryptococcus curvatus</i>	12.0 ± 0.5	3.3 ± 0.1	2.4 ± 0.2	11.0±2.0	4.6±0.6
<i>Kuraishia capsulate</i>	8.0 ± 1.7	6.8 ± 0.3	6.0 ± 0.6	11.8±3.9	3.5±0.2

Таблица 2

P_i, лабильный фосфор и энзиматически определенные полифосфаты в пищевых продуктах

Образец	Фосфорные соединения, мкмоль/г сырой биомассы		
	P _i	Лабильный фосфор	Энзиматически определенные полифосфаты
Замороженное филе нототении	13.0 ± 0.6	2.5 ± 0.6	1.8 ± 0.3
Замороженное филе трески	9.4 ± 0.9	2.0 ± 0.1	0.97 ± 0.03
Сыр	12.9 ± 2.9	6.5 ± 0.6	1.58 ± 0.02

Публикация по материалам данного исследования:

1. L.Lichko, T. Kulakovskaya. Polyphosphatase PPX1 of *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for polyphosphate assay *Advances in Enzyme Research (AER)* ISSN 2328-4854 Vol.3 No.4, Dec 2015.

Полифосфаты и полифосфатазная активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии гена *DDP1*

Трилисенко Л.В., Андреева Н.А., Кулаковская Т.В.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

Неорганические полифосфаты (полиР) в организме человека участвуют в развитии костной ткани, каскаде свертывания крови, воспалении и других процессах (1), поэтому изучение ферментов их метаболизма и гомологичных белков у низших эукариот представляет существенный интерес. У дрожжей имеются инозитолполифосфаты, которые вовлечены в регуляцию везикулярного транспорта, апоптоза и других клеточных процессов (2, 3). В клетках дрожжей имеется также фермент, расщепляющий макроэргическую фосфоэфирную связь этих соединений, дифосфоинозитолполифосфатфосфогидролаза (DDP1, КФ 3.6.1.52). У DDP1 есть три гомолога в клетках человека – это так называемые Nudix-гидролазы (2). Фермент DDP1 проявляет также эндополифосфатазную активность. Вопрос о взаимосвязи обмена инозитолпирофосфата и полиР представляется сложным (2).

Целью настоящей работы была оценка влияния сверхэкспрессии гена *DDP1* на метаболизм полиР у *Saccharomyces cerevisiae*.

Объектом исследования были штаммы дрожжей *S. cerevisiae*: CRN - с инактивированным геном эндополифосфатазы *PPN1* и трансформированный плазмидой штамм - CRN/pMB1_DDP1 Sc, имеющий повышенную экспрессию гена *DDP1*. Штамм получен сотрудниками Центра «Биоинженерия» РАН.

Показано, что на стационарной стадии роста эндополифосфатазная активность у штамма-трансформанта значительно увеличилась по сравнению с исходным штаммом

(рис. 1). Эта активность проявлялась с полиР различной длины цепи: полиР₂₀₈, полиР₁₅, Р_i, РР_i, триполифосфат и АТФ в концентрации 2 мМ в разной степени подавляли эту активность, ADP не оказывал на нее влияния. На стационарной стадии роста в среде с избытком Р_i содержание полиР в клетках штамма-трансформанта на ~ 23 % ниже, чем в клетках исходного штамма CRN, а содержание Р_i, наоборот, выше. Содержание отдельных фракций полиР у трансформанта снизилось в разной степени, от 9% для кислоторастворимой фракции до 39% - для полиР горячего хлорного экстракта (рис. 2А). Средняя длина цепи солерастворимой и щелочерастворимой фракций у обоих штаммов была одинаковой. В то же время длина цепи кислоторастворимой фракции у трансформанта была выше как на стационарной, так и на логарифмической стадиях роста (рис.2Б).

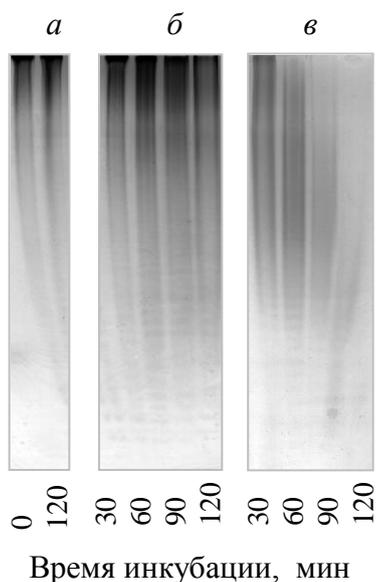


Рис.1. Гидролиз полиР₂₀₈ бесклеточными экстрактами CRN и CRN/pMB1_DDP1 Sc. *a – в* – Электрофореграммы полиР в 24% ПААГ с 7 М мочевиной. *a* – Контроль, полиР без экстракта, *б* – экстракт штамма CRN, *в* – экстракт штамма CRN/pMB1_DDP1 Sc

В условиях фосфорного голодания содержание полиР у обоих штаммов снизилось до одинакового уровня – 12-13 мкмоль Р на 1 г сырой биомассы. При последующем культивировании в полноценной среде у штаммов в течение 1 ч происходило восстановление уровня полиР. У трансформанта по сравнению с исходным штаммом наблюдалось примерно такое же снижение содержания фракций полиР, как и при обычном культивировании. Средняя длина цепи солерастворимой и щелочерастворимой фракций полиР у штаммов была одинаковой, а кислоторастворимой фракции – выше у исходного штамма (рис.2Б).

Полученные данные свидетельствуют о сложном характере участия DDP1 в регуляции содержания и длины цепи неорганических полифосфатов у дрожжей.

Публикации по материалам данного исследования:

1. Л.В. Трилисенко, Н.А. Андреева, М.А. Эльдаров, М.В. Думина, Т.В. Кулаковская. Полифосфаты и полифосфатазная активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии гена *DDP1*. Биохимия, 2015, т.80, в.10, 1588-1594.

Список литературы:

1. Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. *Front. Physiol.*, 5, 260, DOI: 10.3389/fphys.2014.00260 (2014).
2. Lonetti et al. *J. Biol. Chem.*, 286, 31966–31974 (2011).
3. Wilson et al. *Biochem. J.*, 452, 369–379 (2013).

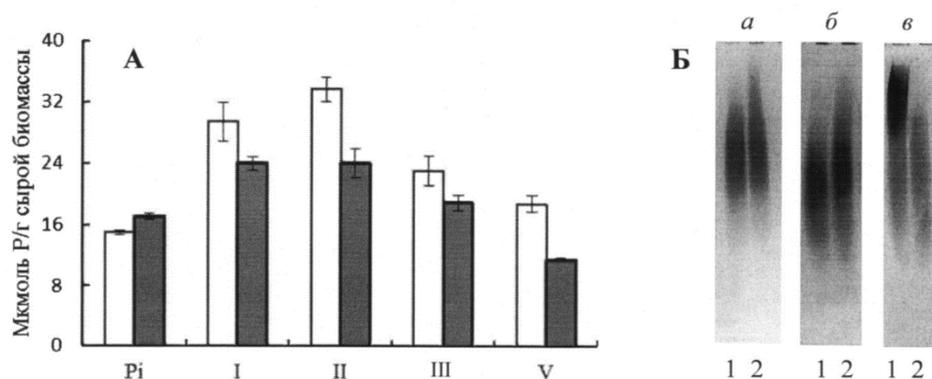


Рис. 2. А – Содержание P_i и фракций полиР в клетках штаммов CRN (□) и CRN/pMB1_DDP1 Sc (■) на стационарной стадии роста. P_i – Ортофосфат, I – кислоторастворимые полиР, II – солерастворимые полиР, III – щелочерастворимые полиР, V – полиР горячего хлорнокислого экстракта. Б – Электрофореграммы кислоторастворимой фракции полиР. а – На логарифмической стадии роста, б – на стационарной стадии роста в среде с 8,2 мМ P_i, в – через 1 ч культивирования в среде с 8,2 мМ P_i после фосфорного голодания. 1 – Штамм CRN, 2 – CRN/pMB1_DDP1 Sc

Трёхмерная модель метакрилатной редокс системы *Geobacter sulfurreducens*

Архипова О.В.¹, Трошина О.Ю.², Микулинская Г.В.³

¹ Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Группа молекулярной биотехнологии ФИБХ РАН

Многие анаэробные бактерии используют ненасыщенные органические соединения в качестве терминальных акцепторов восстановительных эквивалентов [1]. Анаэробная бактерия *Geobacter sulfurreducens* AM-1 использует в качестве конечного акцептора редуктазной цепи метакрилат - соединение антропогенной природы [2]. Трансформацию метакрилата в изобутират у *G. sulfurreducens* AM-1 катализирует периплазматическая метакрилатная редокс система [2]. Она состоит из двух хромопротеидов: флавинодержающей метакрилатредуктазы (Mrd; 50 кДа) и её физиологического донора электронов – цитохрома *c* (Msc; 30 кДа) [2]. Недавно нами был секвенирован полный геном *G. sulfurreducens* AM-1 [3]. Гены *mrd* и *mcs* оказались организованными в оперон. Аминокислотные последовательности обоих компонентов были расшифрованы. **Целью настоящей работы** было исследование потенциальной трёхмерной организации компонентов метакрилатной редокс системы, включая как выявление консервативных аминокислот Mrd, так и анализ их взаимодействия.

Растворимые фумаратредуктазы *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 (Fcc₃-f, Ifc₃) и *Shewanella oneidensis* MR-1 (Fcc₃-o) - единственные из гомологов Mrd и Mcc, для которых известны кристаллические структуры [4-7]. Мы провели сравнительный анализ последовательностей Mrd и Mcc, базируясь на этих данных.

Консервативные участки Mrd и Mcc. Для обоих хромопротеидов метакрилатной редокс системы (и для Mrd, и для Mcc) показано сходство со всеми тремя флавоцитохромами *c*: Fcc₃-f, Ifc₃ и Fcc₃-o. Сходство с Mrd обнаружено для С-концевых последовательностей этих флавоцитохромов на участке между 140-ым и 590-ым аминокислотными остатками. Сходство с Mcc из *G. sulfurreducens* AM-1 наблюдается с N-концевыми последовательностями обсуждаемых флавоцитохромов *c* на участке до 125-ого аминокислотного остатка. У растворимых периплазматических фумаратредуктаз шеванелл и Mcc обнаружены отщепляемые сигнальные пептиды типа Sec, а также консервативные последовательности CXXCH, указывающие на принадлежность к цитохрому *c*.

Согласно классификации, основанной на вторичной структуре [8], Ifc₃, Fcc₃-f и Fcc₃-o можно отнести к семейству FAD-связывающих белков GR (глутатионредуктаз). Домен связывания FAD у белков этого семейства характеризуется наличием укладки Россманна ($\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3$). В целом белки семейства имеют пять центральных параллельных β -складок, окруженных α -спиралями с одной стороны и тремя антипараллельными β -складками – с другой [8]. FAD у белков семейства имеет вытянутую конформацию, в которой остатки аденина и изоаллоксазина расположены дистально друг от друга. У членов семейства консервативно расположение FAD: кольцо аденина направлено внутрь FAD-связывающего домена, кольцо изоаллоксазина – наружу [8]. Mrd также относится к семейству GR.

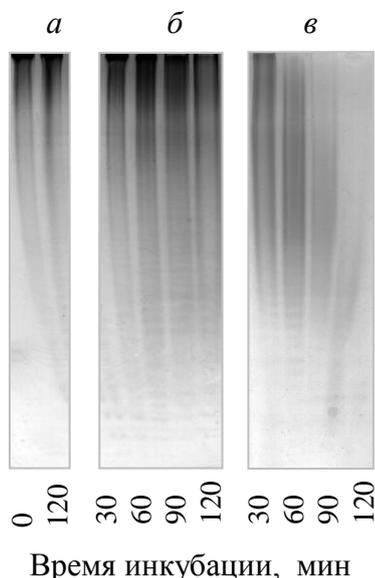


Рис.1. Гидролиз полиP₂₀₈ бесклеточными экстрактами CRN и CRN/pMB1_DDP1 Sc. а – в – Электрофореграммы полиР в 24% ПААГ с 7 М мочевиной. а – Контроль, полиР без экстракта, б – экстракт штамма CRN, в – экстракт штамма CRN/pMB1_DDP1 Sc.

В случае Mrd консервативный фосфатсвязывающий участок (xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)ghxhE(D)) представлен 69-98 аминокислотными остатками незрелого белка [3]. В случае растворимых периплазматических фумаратредуктаз шеванелл: 146-175 аминокислотными остатками у Ifc₃ и 153-182 аминокислотными остатками у Fcc₃-f из *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400, 152-181 аминокислотными остатками у Fcc₃-o из *Shewanella oneidensis* MR-1. В целом этот мотив имеет структуру β -

складка-поворот-β-складка и формирует гибкий «зажим», окружающий и «заякоривающий» пирофосфат FAD [9]. Другой консервативный участок связывания FAD (T(S)xxxxxF(Y)hhGD(E)) присутствует в аминокислотных последовательностях Mrd и флавоцитохромов *c* шеванелл в усечённом виде: без первого остатка треонина обсуждаемого участка. Данному участку соответствуют 487-491 аминокислотные остатки Mrd, 547-551 аминокислотные остатки Ifc₃, 555-559 аминокислотные остатки Fcc₃-f, 555-559 аминокислотные остатки Fcc₃-o. Оба упомянутых участка, широко разнесенные по аминокислотной последовательности, тем не менее расположены в пространственной близости. Кроме того, Mrd содержит консервативные для фумаратредуктаз аминокислотные остатки, участвующие в катализе [4-7], а именно – H461, R501, R353 [3]. Они, как и в случае фумаратредуктаз шеванелл, стабилизируют переходное состояние во время катализа, обеспечивая делокализацию отрицательного заряда промежуточного карбаниона [7]. Наиболее вероятным донором протона для карбаниона является аргинин R353.

Пространственная структура Mrd и Mcc. Компьютерное моделирование трёхмерной структуры Mrd и Mcc *G. sulfurreducens* AM-1 обнаружило, что оба хромопротеида метакрилатной редокс системы проявляют высокое структурное сходство с флавоцитохромом Ifc₃ *S. frigidimarina* NCIMB 400. Mrd и по последовательности, и структурно повторяет два С-концевых каталитических домена этой фумаратредуктазы.

Mcc сходен с малым N-концевым гемсодержащим доменом белка. Но нужно отметить, что с N-конца Mcc удлинен относительно этого домена. За счет этого в его аминокислотной последовательности можно найти не 4, как у этих белков, а 7 гем-связывающих участков, хотя Mcc – тетрагемовый, как было показано экспериментально [2]. На основании структурного наложения Mcc можно предположить, что имидазольные группы двух гемов цитохрома имеют параллельное и двух – перпендикулярное расположение друг относительно друга, аналогично Fcc₃-o [7], что обеспечивает тонкую «настройку» уменьшения потенциала гемов [4].

Заметим, что флавоцитохромы *c*-фумаратредуктазы бактерий рода *Shewanella*, очевидно, имеют модулярную структуру: N-концевой модуль выполняет функцию передачи восстановительных эквивалентов, а С-концевой - обладает ферментативной активностью.

Выраженное сходство структур фумаратредуктаз *S. frigidimarina* и *S. oneidensis* и метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens* AM-1 свидетельствует об их общих происхождении и физиологической роли (или функциональной нагрузке). Не исключено, что основной функцией этих ферментов может оказаться восстановление природного аналога синтетического метакрилата – акрилата.

Список литературы:

1. Архипова О.В., Акименко В.К. (2005) *Микробиология*, 74, 725-737.
2. Mikoulińskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. (1999) *Eur. J. Biochem*, 263, 346-352.
3. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulińskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. (2015) *PLoS ONE*, 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
4. Taylor P. et al. (1999) *Nat. Struct. Biol*, 6, 1108-1112.
5. Doherty M.K. et al. (2000) *Biochemistry*, 39, 10695-10701.
6. Bamford V. et al. (1999) *Nat. Struct. Biol*, 6, 1104-1107.
7. Leys D. et al. (1999) *Nat. Struct. Biol*, 6, 1113 – 1117.
8. Dym O., Eisenberg D. (2001) *Protein Sci*, 10, 1712-1728. Review.
9. Hanks S.K., Hunter T. (1995) *FASEB J*, 9, 576-596.

Синтез L-лактатоксидазы дрожжами *Yarrowia lipolytica* в условиях погруженного культивирования (в биореакторах)

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

Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

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

ЛО широко применяется в различных сферах: в медицине, пищевой промышленности и др. Так, фермент используется для определения содержания лактата в физиологических жидкостях человека (в крови, цереброспинальной жидкости и др.) при различных патологических состояниях. Уровень молочной кислоты служит важным клинико-диагностическим показателем гипоксии, лактоацидоза, шокового состояния, острого инфаркта миокарда и других заболеваний, связанных с неадекватным поступлением кислорода в ткани. Содержание лактата является также важным показателем при производстве вина, молочных и мясных продуктов. На основе ЛО созданы биосенсоры, используемые в медицине, виноделии и производстве продуктов питания.

Среди микроорганизмов ЛО была обнаружена у бактерий *Aerococcus viridans* [1], *Streptococcus faecalis* [2], *Pediococcus* sp. [3], *Lactococcus lactis* [4], а также у грибов *Geotrichum candidum* [5].

Мы обнаружили способность к синтезу ЛО у дрожжей *Yarrowia lipolytica* [6]. Было показано что, фермент синтезируется в процессе роста на L-лактате в качестве единственного источника углерода и энергии (в экспоненциальной фазе роста). Кроме того, показан синтез фермента при росте дрожжей на глюкозе - или в стационарной фазе роста (при исчерпании глюкозы) или после адаптации клеток к стрессовым условиям (окислительный или тепловой стресс). В настоящей работе были определены оптимальные условия синтеза ЛО клетками *Y. lipolytica* в биореакторах лабораторного типа АНКУМ-2М.

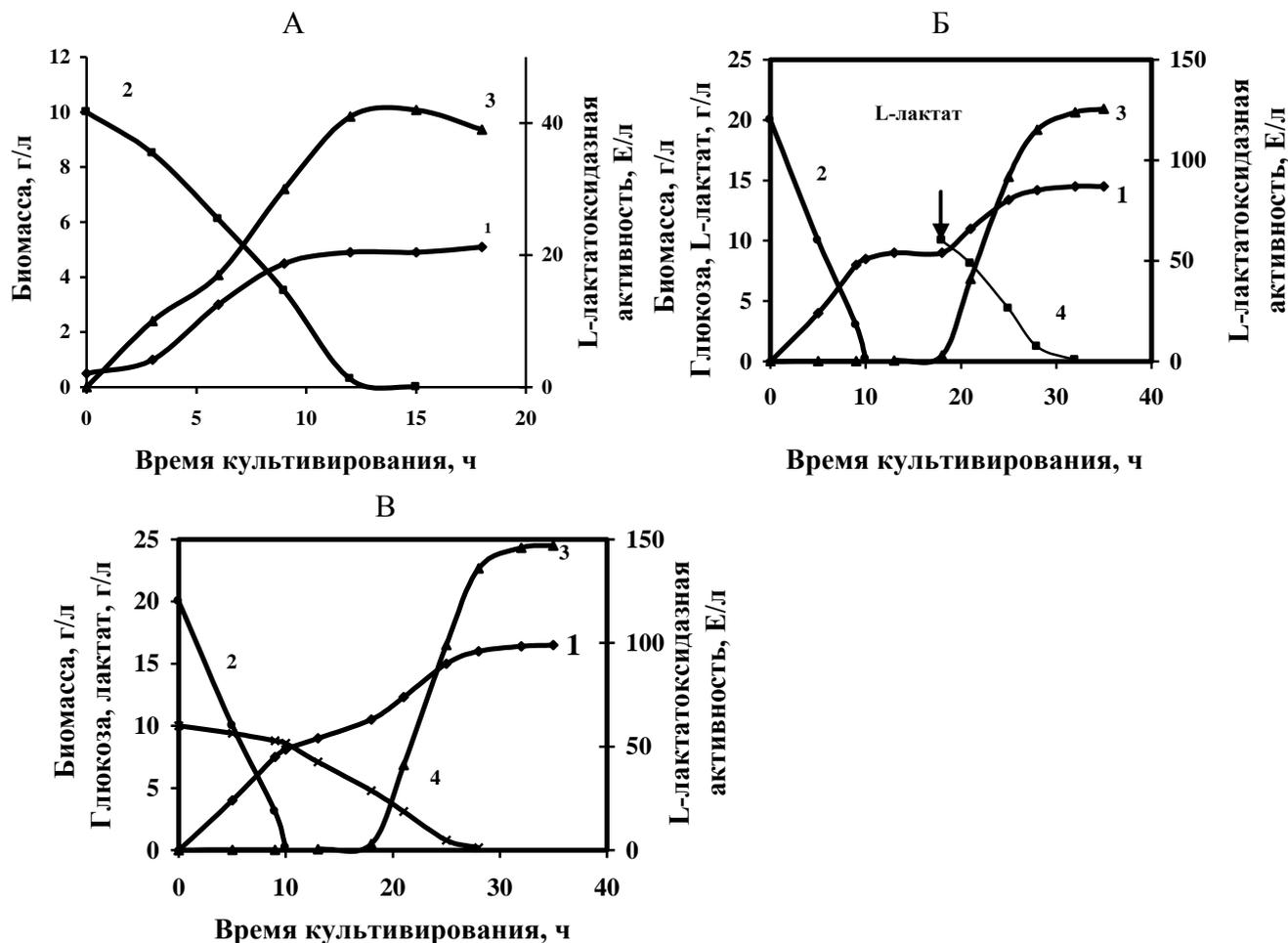
В работе использовали дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378, полученные из ВКМ (ИБФМ РАН). Штамм-продуцент был отобран в результате скрининга 14 музейных штаммов *Y. lipolytica*. Для получения ЛО дрожжи выращивали в биореакторах усовершенствованной конструкции на основе АНКУМ-2М. Общий объем ферментера составлял 10 л, рабочий объем - 6 л.

Установлено, что оптимальными для роста клеток и биосинтеза фермента являются следующие условия: температура 28°C, pH - 5.5, pO₂ - 70%. В качестве субстрата роста (источника углерода и энергии) использовали глюкозу (2%) и/или L-лактат (0.5%). Оказалось, что максимальное накопление ЛО активности (150 Е/л) наблюдалось в клетках, выращенных на глюкозе в присутствии L-лактата (рис. Б и В). Накопление ЛО активности в культуральной жидкости определялась уровнем биомассы на единицу объема. При этом, синтез ЛО на 1 г биомассы был одинаков в клетках, выращенных на L-лактате и в клетках, выращенных на глюкозе в присутствии L-лактата (9-10 Е/г сух. биомассы).

В литературе отсутствуют данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО.

Была разработана 3-стадийная схема очистки фермента, включающая ионообменную и гидрофобную хроматографию. Очищенный до гомогенного состояния фермент, представляет собой октамер с молекулярной массой 230 КДа. Удельная

активность составляла 5 Е/мг белка, степень очистки – 358, а выход 0,022% по белку и 8 % по активности.



Синтез L-лактатоксидазы клетками *Y. lipolytica* при культивировании в ферментере АНКУМ-2М.

А - рост на L-лактате:

1 - биомасса, 2 - L-лактат, 3 - L-лактатоксидазная активность;

Б, В - рост на глюкозе и L-лактате:

1 - биомасса, 2 - глюкоза, 3 - L-лактатоксидазная активность, 4 - L-лактат.

Список литературы:

1. Duncan J. D., Wallis J. O., Azari M. R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. P. 919-926.
2. Mizutani F., Sasaki K., Shimura Y. // Anal. Chem. V. 1983. V. 55. P. 35-38.
3. Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. // J. Dairy Sci. 1989. V. 72. P. 859-863.
4. Atsusi T., Yoshiaki N. // J. Ferment. Bioeng. 1998. V. 85. P. 507-510.
5. Куплетская М.Б., Сухачева М.В., Кураков А.В., Нетрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 199-202.
6. Бирюкова Е.Н., Ступарь Я.О., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г. // Микробиология. 2009. Т. 78, № 5. С. 716–718.

Низкомолекулярный антимикробный пептид из *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

Способность к существованию в экстремальных условиях обеспечивается механизмами, действие которых включает синтез ряда ферментов, а также защитных или сигнальных метаболитов. Один из адаптационных механизмов - синтез белков и пептидов с антимикробными свойствами. Антимикробные пептиды являются важнейшими компонентами антибактериальной защиты организмов практически всех уровней жизни – бактерий, грибов, растений, амфибий, насекомых, птиц и млекопитающих [1, 2]. Молекулы этих соединений характеризуются небольшой мол. массой (до 5 кДа) и атипичными структурными свойствами – наличием в составе пептидной цепи гидрофобных непротеиногенных аминокислот таких как аминок-изобутират, изолейцин, изовалин и др. [3].

Именно способность к образованию антибиотических соединений различной химической природы, в том числе антимикробных пептидов, лежит в основе использования почвенных грибов рода *Trichoderma* в качестве биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений, вызванными фитопатогенными грибами (биоконтроль) [4].

В данной работе показана способность гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМФ-4268D к синтезу низкомолекулярного пептида, проявляющего антимикробные свойства.

Экспериментальная часть. Гриб культивировали на среде с пшеничными отрубями (2%) в течении 14 суток. Пептид экстрагировали из культуральной жидкости этилацетатом. Очистку осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Оценку молекулярной массы, а также степени очистки пептида проводили с помощью масс-спектрометрического анализа autoflex speed (Bruker). Анализ С- и N-концов полипептида проводили методом ферментативного гидролиза с помощью карбоксипептидазы и аминопептидазы и последующим определением молекулярного веса продуктов "лестницы" maXis impact; autoflex speed (Bruker).

Антимикробную активность тестировали используя *Bacillus subtilis* на чашках с агаром. В лунку диаметром 0.5 мм вносили 50 мкл раствора пептида в метаноле в концентрациях 50 – 3 мкг. Зону ингибирования регистрировали через 24 час роста при 37⁰С.

Механизм антибактериального действия пептида исследовали по изменению мембранного потенциала целых клеток бактерий *Bacillus subtilis* и нативных митохондрий, выделенных из дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКМ Y-2378. Тансмембранный потенциал измеряли с помощью флюоресцентного красителя 3,3'-дипропилтиодикарбонил-цианид иодида, учитывая его энергозависимый транспорт.

Был выделен не описанный ранее пептид с m/z 1147.8212 ([M + H], calcd. 1203.8011 (for C₅₆H₉₉N₁₂O₁₃). Установлено, что пептид состоит из 11 аминокислотных остатков в последовательности: Acetyl-Val-Gln-Leu-Leu-Aib-Pro-Gln-Leu-Aib-Pro-Leuol.

Конц. пептида, мкг в лунке	50	25	12,5	6	3
Зона ингибирования, мм	15	15	12	4	0

Показано антимикробное действие пептида (таблица). Ингибирование роста бактерий *B. subtilis* отмечалось при дозах более 6 мкг в лунке.

Установлено, что действие пептида связано с нарушением проницаемости мембраны бактерий и митохондрий и снижением мембранного потенциала (рис.1, кривые 1 и 3), аналогично действию классического разобщителя окислительного фосфорилирования ТХКФ (кривая 2).

Установленный механизм действия выделенного пептида позволяет отнести его к мембраноактивным пептидам. Мембраноактивные антимикробные пептиды являются перспективной альтернативой традиционным антибиотикам из-за отсутствия резистентности к ним микроорганизмов.

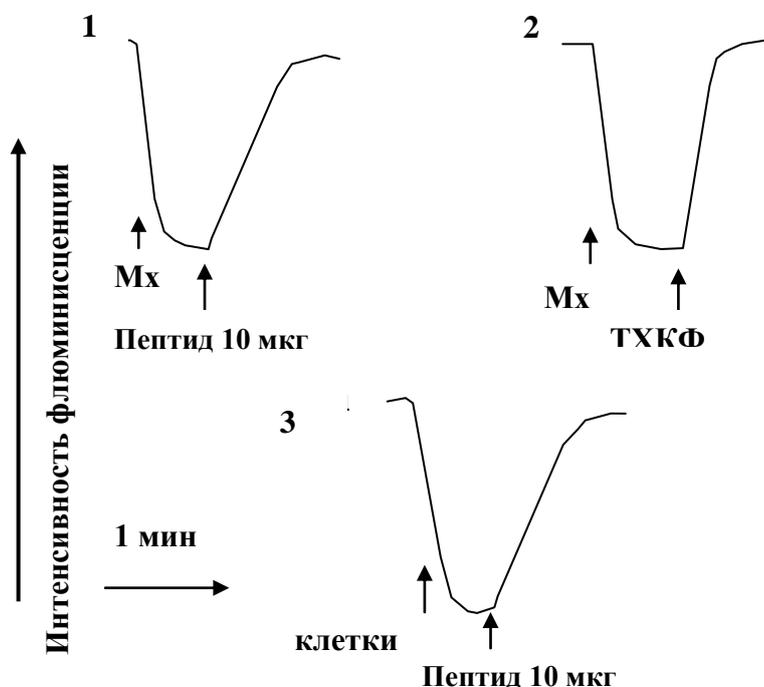


Рис. 5. Влияние пептида и ТХКФ на трансмембранный потенциал клеток бактерий и митохондрий дрожжей. Митохондрии (Mx) - 0.8 мг/мл, клетки бактерий -1.2 мг/мл, пептид -10 мкг, ТХКФ и валиномицин - 5 мкМ. В качестве субстрата митохондрий использовали (пируват + малат по 10 мМ)

Список литературы:

1. Yanmei Li , Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012; 37(2):207-15.
2. Scott MG , Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000; 20(5):407-31.
3. Albrecht Berg, Pavel A. Grigoriev, Thomas Degenkolb, Torsten Neuhof, Albert Härtl, Brigitte Schlegel, Udo Gräfe Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276 *Journal of Peptide Science J. Peptide Sci.* 9: 810–816 (2003).
4. Nagao J., Asaduzzaman S.M., Aso Y., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm/*J. Bioscience and Bioengineering*. 2006. 102, №3. P.139-149.

Новые штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* - продуценты α-кетоглутаровой кислоты

**Камзолова С.В.¹, Лунина Ю.Н.¹, Пунтус И.Ф.²,
Самойленко В.А.³, Моргунов И.Г.¹**

¹ Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

³ Сектор биотехнологических процессов ИБФМ РАН

В настоящее время наряду с традиционным применением органических кислот в различных сферах производства рассматривается их использование в качестве «строительных блоков» для получения ряда важных соединений технического, пищевого и медицинского назначения. В литературных источниках рассматриваются перспективы использования α-кетоглутаровой кислоты (КГК) в качестве предшественника для синтеза синтетических материалов с практически ценными свойствами, которые при достаточных масштабах производства могут найти широкое применение в промышленности, пищевом производстве, медицине, сельском хозяйстве и других сферах производства. До сих пор КГК производят только методом химического синтеза. Метод является сложным и взрывоопасным.

Тиамин-ауксотрофные дрожжи *Yarrowia lipolytica* (несинтезирующие пиримидиновую часть молекулы витамина) способны к «сверхсинтезу» КГК. При лимитировании роста дрожжей тиаминном происходит блокировка ЦТК на уровне α-кетоглутаратдегидрогеназы, при этом ресинтез оксалоацетата осуществляется через глиоксилатный шунт. Наиболее активная продукция КГК происходит на средах с субстратами, не репрессирующими ключевой фермент глиоксилатного цикла - изоцитрат-лиазу (n-алканы, этанол, триглицериды и др.). Ранее в ИБФМ РАН были разработаны методы получения КГК с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*, но использование в качестве субстратов высокотоксичных (этанол) или непищевых (n-алканы) субстратов затрудняло проведение технологического процесса и не позволяло получать целевой продукт пищевого и медицинского назначения. Использование новых субстратов и новых штаммов-продуцентов позволит сделать процесс микробиологического получения КГК более эффективным и получать целевой продукт с более высоким выходом и качеством.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение «сверхсинтеза» КГК природными, мутантными (полученными методами классической генетики) и рекомбинантными (сконструированными молекулярно-генетическими методами) штаммов дрожжей *Y. lipolytica* на средах с рапсовым маслом в качестве субстрата. Проведена селекция природных штаммов - продуцентов КГК; разработаны методики получения мутантных штаммов продуцентов, разработаны генетические конструкции рекомбинантных штаммов; оптимизированы параметры процесса биосинтеза; проведено масштабирование процесса биосинтеза КГК в ферментерах объемом 500 л; разработана процедура очистки целевого продукта и наработаны опытные партии высокоочищенного препарата монокалийевой соли КГК. В работе были использованы: специально селекционированный природный штамм *Y. lipolytica* 212; мутант, полученный комбинированным (химическим и УФ-мутагенезом) *Y. lipolytica* UV7/NG40; и рекомбинантный штамм с суперэкспрессией мультикопийного гена ICL1. *Y. lipolytica* 212 (pICL1)t1.

При проведении культивирования в ферментере АНКУМ-2 М объемом 10 л. опытных штаммов-продуцентов подтверждены следующие гарантируемые технические характеристики: концентрация целевого продукта в конце ферментации – более 70 г/л; выход от использованного субстрата - 67-90 % (таблица); опытные образцы препаратов КГК имеют чистоту – более 99%.

Таблица

Биосинтез КГК у различных штаммов дрожжей *Y. lipolytica*

Штамм	Биомасса (г/л)	КГК (г/л)	ПВК (г/л)	КГК:ПВК	УКГК (%)
Природный штамм <i>Y. lipolytica</i> 212	20,0	73,0	5,6	28:1	67
Мутант <i>Y. lipolytica</i> UV7/NG40	18,2	90,0	3,2	28:1	80,0
Рекомбинантный штамм <i>Y. lipolytica</i> 212 (pICL1) _{T1}	20,0	87,0	2,0	44:1	90,0

Показано, что мутантные и рекомбинантные штаммы обладают рядом преимуществ перед природными штаммами – накопление КГК более чем на 21% выше и повышение выхода КГК на 27% .

На способ получения получения КГК из рапсового масла с помощью дрожжей *Y. lipolytica* получен РФ № 2551964 (дата публикации 27.01. 2015).

Сравнительная характеристика диоксигеназ расщепления ароматического кольца из *Rhodococcus opacus* 1СР и *Rhodococcus wratislawiensis* G10 при росте на бензоате натрия

Соляникова И.П.¹, Борзова О.В.^{1,2}, Шумкова Е.С.^{1,3}, Головлёва Л.А.¹

¹ Лаборатория энзиматической деградации органических соединений ИБФМ РАН

² Пущинский государственный естественно-научный институт

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, г. Москва

Бензойная кислота и её соли широко применяются в промышленности в качестве консервантов, что может приводить к их накоплению в окружающей среде. Считается, что бензоат натрия (БNa) в низких концентрациях не обладает токсическим влиянием на организмы млекопитающих, но ряд исследователей не исключает его негативного воздействия. Кроме того, БNa является интермедиатом в биodeградативных путях различных поллютантов (например, бифенила, стирола).

Целью работы было охарактеризовать диоксигеназы, отвечающие за раскрытие ароматического кольца, индуцирующиеся у актинобактерий *Rhodococcus opacus* 1СР и *Rhodococcus wratislawiensis* G10, при росте на БNa. Были получены ростовые кривые и определены время удвоения биомассы (t_d) и максимальная удельная скорость роста (μ_{max}) на БNa актинобактерий *R. opacus* 1СР и *R. wratislawiensis* G10 (табл. 1, 2; рис. 1, 2). Показано, что критическими значениями концентраций ростового субстрата являются 500 мг/л для *R. opacus* 1СР и 2 г/л для *R. wratislawiensis* G10, так как с повышением концентрации БNa происходит резкое ухудшение ростовых параметров данных культур.

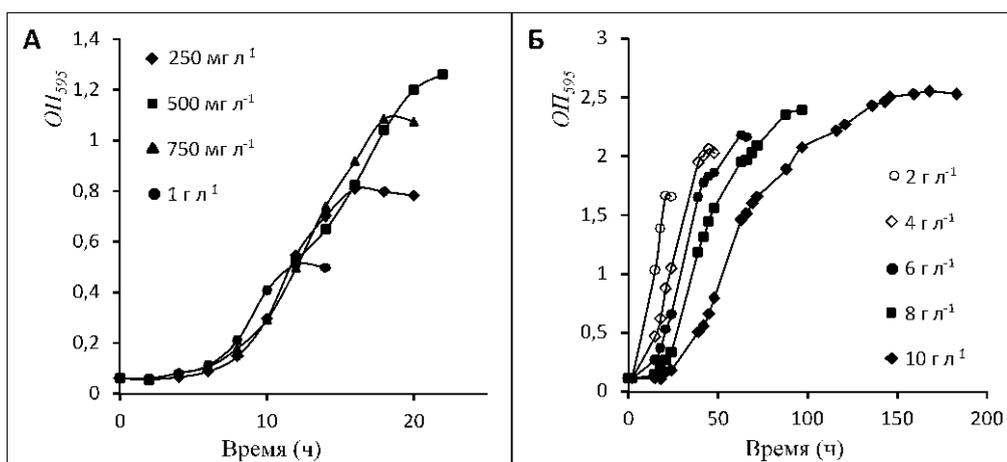


Рис. 1. Кривые роста *R. oracius* 1CP на БНа

Таблица 1

Ростовые параметры *R. oracius* 1CP на БНа

Концентрация бензоата, г/л	μ_{\max} , ч ⁻¹	t_d , ч
0,25	0,33	2,09
0,5	0,26	2,66
0,75	0,16	4,19
1	0,16	4,25
2	0,17	4,1
4	0,11	6,4
6	0,11	6,3
8	0,09	7,4
10	0,07	10,5

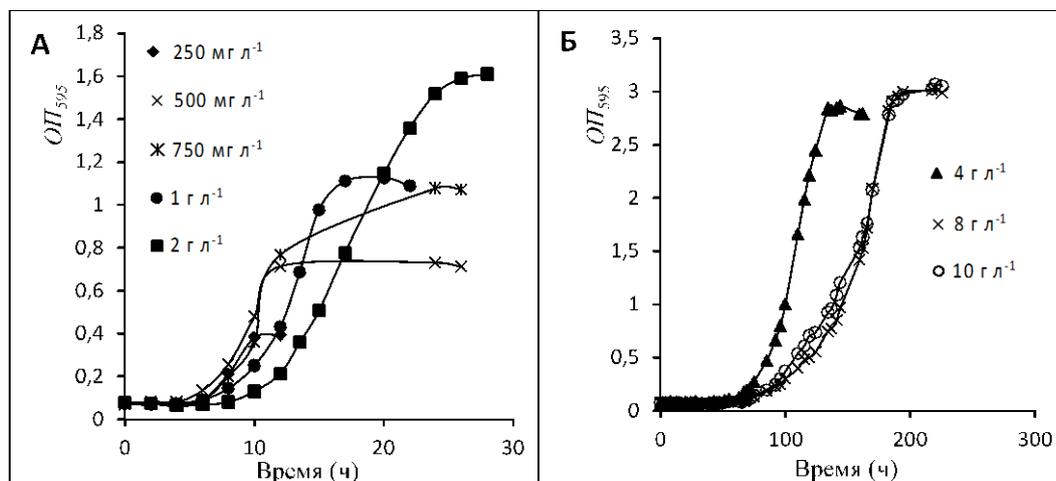


Рис. 2. Кривые роста *R. wratislaviensis* G10 на БНа

Ростовые параметры *R. wratislaviensis* G10 на БNa

Концентрация бензоата, г/л	μ_{max} , ч ⁻¹	t_d , ч
0,25	0,43	1,61
0,5	0,30	2,25
0,26	0,26	2,63
1	0,24	2,94
2	0,16	4,25
4	0,052	13,31
8	0,043	16,24
10	0,036	19,00

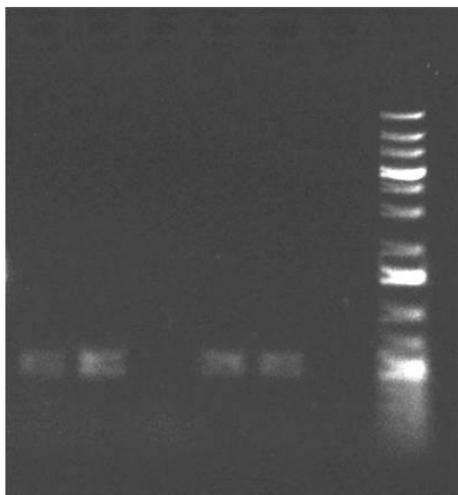
В клетках обеих культур, выращенных на БNa, была обнаружена активность двух диоксигеназ, раскрывающих ароматическое кольцо: пирокатехин 1,2-диоксигеназы (ПК 1,2-ДО) и протокатехоат 3,4-диоксигеназы (ПКК 3,4-ДО), являющихся ключевыми ферментами двух различных путей разложения бензоата. Удельная активность ПК 1,2-ДО из *R. opacus* 1СР в бесклеточном экстракте при росте на высоких концентрациях БNa (6 г/л) была на порядок ниже (0,03 ед./мг белка), чем при росте на низких (0,31 ед./мг белка).

ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР была очищена за 4 этапа в 114 раз с выходом по общей активности 18,4%. ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10 была очищена за 3 этапа в 6,2 раза с выходом по общей активности 24%. Определены основные характеристики этих ферментов.

Для ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10 значение K_M , с протокатеховой кислотой в качестве субстрата, составило 25,9 мкМ, а максимальная скорость реакции, V_{max} , - 12,11 ед./мг белка. Для ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции с тем же субстратом имели следующие значения: $K_M = 39,7$ мкМ и $V_{max} = 27,1$ ед./мг белка. Значение рассчитанной на основании этих показателей константы специфичности (V_{max}/K_M) для ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР примерно на 30% выше, чем для ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10. Для ПК 1,2-ДО из *R. opacus* 1СР было обнаружено стимулирующее влияние протокатеховой кислоты на её активность с пирокатехином. Протокатехоат не оказывал никакого влияния на реакцию ПК 1,2-ДО из *R. wratislaviensis* G10 с пирокатехином. Не обнаружено влияния пирокатехина на реакцию ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР с протокатехоатом, однако пирокатехин являлся слабым ингибитором реакции ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10 с протокатехоатом. По субстратной специфичности ПК 1,2-ДО из *R. opacus* 1СР похожа на фермент этой же культуры, выращенной на *para*-толуате, и отличалась от описанной ранее ПК 1,2-ДО, выделенной из *R. opacus* 1СР при росте на БNa.

Температурный оптимум ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10 равен 50°C, а ПКК 3,4-ДО культуры *R. opacus* 1СР – 40°C. Фермент ПКК 3,4-ДО из *R. wratislaviensis* G10 более термостабилен. При 40°C за 2 часа не происходило падения активности. При 50°C снижение было на 40% за 5 минут и на 100% за 10 минут. При 60°C фермент полностью инактивировался за 5 минут. За 2 часа активность ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР при 40°C снизилась на 31%. При 50°C этот показатель составил 86% за 5 минут, фермент полностью инактивировался за 20 минут. При 60 °C фермент полностью инактивировался за 0,5 минут. Данные ферменты характеризуются близкими значениями оптимального уровня pH: для ПКК 3,4-ДО из культуры *R. wratislaviensis* G10 - 9,25 ед, а для ПКК 3,4-ДО из *R. opacus* 1СР - 9,0.

С ДНК-матрицы штамма *Rhodococcus* sp. G10 были амплифицированы фрагменты генов *pcaG* и *pcaH* (кодируют α - и β -субъединицы протокатехоат 3,4-диоксигеназы), длиной около 500 п.н. Гены *pcaG* и *pcaH* были на 99% сходны с генами α - и β -субъединицы протокатехоат 3,4-диоксигеназ *R. opacus* 1CP



1 2 3 4 5 6 7

Рис. 3. Амплификация генов *pcaG* и *pcaH*. 1 - *pcaH* *R. opacus* 1CP (положительный контроль), 2 - *pcaH* *R. wratislaviensis* G10, 3 - отрицательный контроль, 4- *pcaG* *R. opacus* 1CP (положительный контроль), 5 - *pcaG* *R. wratislaviensis* G10, 6 - отрицательный контроль, 7- маркер молекулярных масс GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Латвия).

По результатам работы принята в печать статья Benzoate degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP after a dormancy: characterization of dioxygenases involved in the process. Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Borzova O.V., Golovleva L.A. J. Environm. Sci. Health, 2015 DOI: 10.1080/03601234.2015.1108814.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 14-14-00368.

Ацетилирование гербицида глифосата - новый способ его деструкции почвенными бактериями *Achromobacter* sp. Kg 16

Шушкова Т.В., Винокурова Н.Г., Зеленкова Н.Ф., Баскунов Б.П., Свиридов А.В., Ермакова И.Т., Леонтьевский А.А.

Лаборатория микробной энзимологии ИБФМ РАН

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что при обработке растений гербицидом глифосатом (ГФ), он накапливается в почве и сохраняется в ней длительное время, вызывая ряд негативных последствий. Наиболее эффективным способом его разрушения в окружающей среде является микробная деградация. Микроорганизмы из разных таксономических групп способны осуществлять ферментативный разрыв С-Р связи в составе ГФ и использовать высвобождающийся неорганический фосфор в биосинтетических и метаболических процессах. Основными метаболитами деструкции ГФ являются аминотетрагидропиримидиновая кислота – стабильный ксенобиотик, образующийся при отщеплении от ГФ двухуглеродного остатка, содержащего в своей структуре трудногидролизуемую С-Р связь (фосфонатазный путь катаболизма ГФ) и саркозин, образующийся при расщеплении С-Р связи непосредственно в структуре ГФ (саркозиновый путь).

Два лучших штамма-деструктора ГФ из лабораторной коллекции заметно различаются по физиологическим параметрам: приросту биомассы, удельной скорости роста, эффективности деструкции ксенобиотика. При росте в жидких средах у штамма *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 эти значения были в 2-2.5 раза выше ($ОП_{560}$ 5.5-6.0, μ_{max}

0.1-0.12 h⁻¹), чем у *Achromobacter sp.* Kg 16 (ОП₅₆₀ 2.0-2.5, μ_{\max} 0.05-0.06 h⁻¹). А в условиях разложения ГФ в почве лучшие показатели его деструкции были у *Achromobacter sp.* Kg 16.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы выяснить причину особенностей ростовых характеристик штамма *Achromobacter sp.* Kg 16 при использовании ГФ в качестве источника фосфора, которые могли быть как следствием условий культивирования штамма, так и результатом образования метаболита этого органофосфоната, оказывающего ингибирующее воздействие на клетки бактерий.

В ходе проведенных работ было показано, что в средах с другими источниками фосфора - ортофосфатом или метилфосфоновой кислотой (МФК) - биомасса и удельная скорость роста *Achromobacter sp.* Kg 16 были сопоставимы с величиной этих параметров у *O. anthropi* ГРК 3. Однако в среде с ГФ изменение степени адаптации клеток к ГФ, продолжительности предварительного голодания по фосфору посевного материала, соотношения начальной концентрации ГФ и клеток (удельной нагрузки), исходной концентрации в среде источников углерода (глутамата) и фосфора (ГФ), дополнительное внесение в среду витаминов группы В и ароматических аминокислот, синтез которых ингибируется ГФ, не приводили к сколько-нибудь заметному улучшению ростовых характеристик. Низкая биомасса в среде с ГФ не могла быть следствием лимитирования роста минеральными и органическими компонентами среды и, по-видимому, определялась особенностями фосфорного метаболизма *Achromobacter sp.* Kg 16.

Аминометилфосфоновая кислота или саркозин, как продукты деструкции ГФ, не обнаруживались ни в культуральной жидкости, ни в гомогенате клеток *Achromobacter sp.* Kg 16, что свидетельствовало о функционировании нового механизма деградации ГФ у изучаемого штамма бактерий. Применение современных методов анализа ВЭЖХ, ТСХ и МС позволило установить, что при росте штамма в среде с ГФ происходит ацелирование гербицида и накопление ацетилглифосата (АцГФ) в культуральной жидкости. Структура АцГФ, выделенного из культуральной жидкости *Achromobacter sp.* Kg 16, была доказана вышеуказанными методами в сравнении с синтезированным веществом. Впервые показано, что АцГФ может использоваться бактериями в качестве единственного источника фосфора, однако в этом случае максимальная биомасса *Achromobacter sp.* Kg 16 достигает лишь 30 - 40 % по сравнению с ростом на ГФ (ОП 0.8 - 1.0 с АцГФ и 2.2 - 2.5 с ГФ).

Т.о. изучение метаболизма ГФ у штамма *Achromobacter sp.* Kg 16 показало функционирование нового механизма превращения ГФ в ацГФ и дальнейшую утилизацию последнего, связанную с разрывом С-Р связи, что указывает на многообразие способов деструкции гербицида микроорганизмами наряду с фосфонатазным и саркозиновым путями.

Физиологическая роль ацелирования ГФ у *Achromobacter sp.* Kg 16 остается неясной. По литературным данным, ацелирование служит способом детоксикации ГФ у некоторых бактерий и растений. Однако ГФ не ингибирует рост изучаемого штамма и его детоксикация не является необходимым условием. Вопрос о том, ингибирует АцГФ размножение клеток, или снижает эффективность механизмов транспорта и утилизации ГФ у этой бактерии, требует дальнейшего исследования.

Полученные данные могут быть использованы для создания трансгенных растений, устойчивых к гербициду глифосату. Кроме того, высокая деструктивная активность штамм *Achromobacter sp.* Kg 16 в почве позволяет рассматривать его как основу для

разработки способов биологической очистки жидких сред и почвы от загрязнения ГФ в промышленности и сельском хозяйстве.

Двухдоменные лакказы из бактерий рода *Streptomyces*: исследование структуры и свойств ферментов

Трубицина Л.И.¹, Лисов А.В.¹, Захарова М.В.², Леонтьевский А.А.¹

¹ Лаборатория микробной энзимологии ИБФМ РАН

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Лакказа (*para*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) – фермент, распространённый среди растений, грибов, бактерий. Благодаря высокому окислительному потенциалу лакказа активно применяется в промышленности. Двухдоменные лакказы (2д) – новая подгруппа лакказ бактериального происхождения. В настоящее время исследованы 7 ферментов, относящихся к группе 2д лакказ. Наличие информации только о семи представителях группы 2д лакказ не даёт возможности сложить чёткое представление о недавно обнаруженной группе ферментов. Исследование новых 2д лакказ позволит определить соответствие ферментов критериям биотехнологической значимости и найти им возможное применение.

Ранее нами были клонированы и экспрессированы три гена 2д бактериальных лакказ из штаммов *Streptomyces viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *S. lividans* Ac-1709. Ферменты были очищены и проведена их частичная характеристика. Целью данной работы выступает дальнейшее исследование свойств, а также структуры рекомбинантных белков.

Были исследованы рН-стабильность, влияние ингибиторов на активность ферментов, рассчитаны кинетические параметры окисления нефенольных (2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота) (АБТС)) и фенольных (2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ)) субстратов. Таблица 1 суммирует данные о физико-химических свойствах и кинетических характеристиках ферментов. Установлено, что все ферменты более стабильны при щелочных значениях рН. В щелочных условиях не ингибируются азидом и фторидом натрия. Более эффективно окисляют нефенольные соединения. Показано, что лакказы в паре с медиатором АБТС способны окислять трифенилметановые соединения (малахитовый зелёный, бриллиантовый зелёный, фуксин).

Кристаллы лакказ, пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены благодаря клонированию рекомбинантных белков без сигнального пептида. На рисунке 1А представлена структура лакказы SgfSL. Структурный анализ показал наличие 12 атомов меди на молекулу тримера, состоящего из шести купредоксиновых доменов. Т2/Т3-медный кластер локализован между вторым доменом одного мономера, несущего Т1-медный центра, и первым доменом другого мономера, не несущего Т1-медный центр. Структуры 2д лакказ SvSL и SLAC аналогичны представленной структуре.

Сравнительный анализ субстратного канала 2д лакказы SvSL и лакказы из *Trametes versicolor* выявил следующие различия. Во-первых, субстратный канал 2д лакказы более узкий, что, вероятно, влияет на более низкую скорость окисления фенольных субстратов. Во-вторых, аминокислоты, формирующие стены канала у 3д лакказы представлены неполярными остатками (лейцин, пролин, фенилаланин), а у 2д лакказы полярными

(треонин, глутамин). В частности, две аминокислоты, расположенные у входа в канал – аспартат и глутамат, в щелочной среде приобретают отрицательный заряд и препятствуют проникновению азид- и фторид- ионов к Т2/Т3 кластеру. Три дополнительных гистидина (151, 161 и 223) из микроокружения Т2/Т3-кластера, вероятно, также депротонируются, внося вклад в формирование отрицательного заряда субстратного канала при щелочных значениях рН. Этим можно объяснить отсутствие ингибирующего эффекта азидата и фторида натрия на активность 2д лакказы при щелочных значениях рН.

Таблица 1

Физико-химические характеристики 2д лакказ

Лакказа	SvSL (<i>S. viridochromogenes</i>)	SgfSL (<i>S. griseoflavus</i>)	SLAC (<i>S. sp.</i>)
Молекулярная масса, кДа (мономер/тример)	37,3/110	41,5/106	40,5/118
рН-оптимум	АБТС – 4,5 2,6-ДМФ – 8,4	АБТС – 4,2 2,6-ДМФ – 9,2	АБТС – 4,0 2,6-ДМФ – 8,5
рН-стабильность	9-11	7-9	11
Температурный оптимум, °С	90	75	65
Термостабильность, остаточная активность за 1 ч, %	50% – при 90°С; 40% – при 98°С	36% – при 90 °С; 6% – при 98 °С	45% – при 60°С; 20% – при 70°С
Влияние ингибиторов, остаточная активность, %	рН 8,4: NaN ₃ (1 мМ) – 105; NaF (1 мМ) – 100,2; ЭДТА (1 мМ) – 78	рН 9,2: NaN ₃ (1 мМ) – 98; NaF (1 мМ) – 92,9; ЭДТА (1 мМ) – 84	рН 8,5: NaN ₃ (10 мМ) – 109; NaF (1 мМ) – 109,8; ЭДТА (1 мМ) – 33
Кинетические характеристики: K _m , мМ; k _{cat} , с ⁻¹	АБТС: K _m – 0,79; k _{cat} – 11,6 2,6-ДМФ: K _m – 1,68 k _{cat} – 0,5	АБТС: K _m – 0,178; k _{cat} – 12,6 2,6-ДМФ: K _m – 0,44 k _{cat} – 0,1	АБТС: K _m – 0,52; k _{cat} – 12,9 2,6-ДМФ: K _m – 3,73 k _{cat} – 0,98

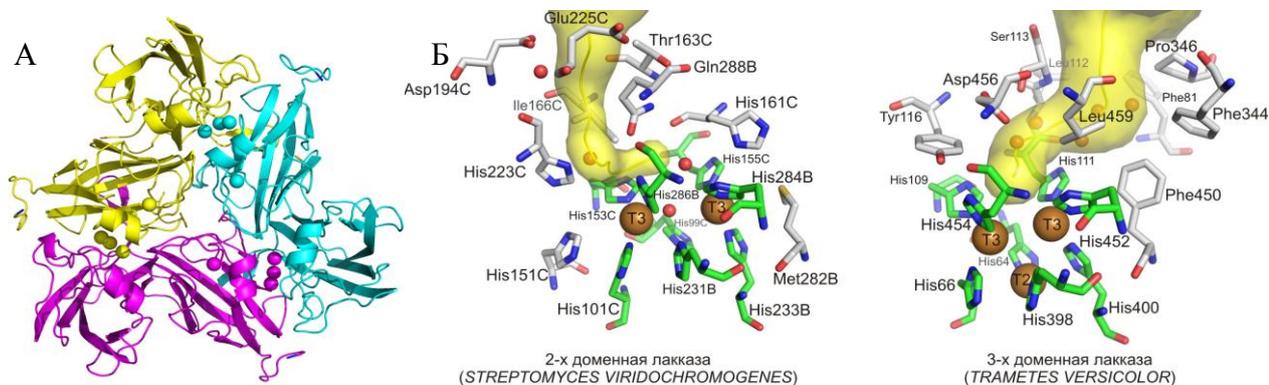


Рис. 1. Структура 2д лакказы SgfSL (А). Структура субстратного канала лакказы SvSL и лакказы из *Trametes versicolor* (Б)

**Биосинтез такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces*
и селекция высокоактивного штамма-продуцента**

**Пошехонцева В.Ю., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А.,
Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В.**

Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

Введение в медицинскую практику иммунодепрессантов в настоящее время является обязательным при трансплантологических операциях. Самое широкое распространение и лучшие показатели при минимальных побочных воздействиях имеет такролимус.

Такролимус (FK-506) – международное непатентованное название лекарственного препарата группы иммунодепрессантов, представляющего собой 23-членный макроциклический поликетид.

Такролимус успешно используется в трансплантологии для профилактики и лечения отторжения трансплантата, дерматологии, офтальмологии, лечении аутоиммунных заболеваний. Для него установлена антибактериальная и противогрибковая активность в отношении широкого спектра бактерий, простейших, дрожжей и микроскопических грибов, противовирусная активность в отношении ряда вирусов; нейрорегенеративная и нейропротективная активности. В настоящее время такролимус включен в перечень ЖВНЛС [1].

В мировой практике биосинтез такролимуса осуществляется природными, мутантными и генетически модифицированными штаммами актинобактериями рода *Streptomyces*. Одним из самых существенных недостатков современных технологий микробиологического синтеза такролимуса является низкий уровень биосинтетической активности, ее нестабильность у большинства известных штаммов-продуцентов, а также их выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость.

Целью настоящей работы являлась разработка эффективного метода микробиологического синтеза такролимуса. В рамках заявленной цели был поставлен ряд задач: 1) селекция высокоактивного штамма-продуцента такролимуса; 2) отработка условий поддержания штамма в стабильном состоянии; 3) дизайн питательных ростовой и биосинтетической сред; 4) оптимизация режима ферментации.

В работе был использован штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д [2]. Установлены его преимущества в сравнении с рядом других продуцентов. Проведена идентификация штамма до вида с применением метода полифазной таксономии. Штамму присвоено видовое название *Streptomyces tsukubaensis* [3].

Определены критерии селекции наиболее активных морфотипов штамма, отличающиеся друг от друга по структуре колонии. Морфотипы получали высевом культуры на солодово-дрожжевую агаризованную питательную среду. Каждый из них анализировали на биосинтетическую активность в отношении такролимуса. Показано, что самый продуктивный морфотип, дающий наибольший выход при биосинтезе (в среднем на 10-18%), представлен интенсивно окрашенными кирпично-оранжевыми колониями округлой формы, 7-13 мм в диаметре, с выраженной структурной дифференциацией поверхности [4].

Отработаны условия поддержания высокопродуктивного морфотипа в стабильно-активном состоянии. Культуру хранили на чашках Петри при 4°C, в жидком замороженном виде в равных долях с 50%-ым глицерином при температуре –20°C и –70°C. Показано, что эффективным способом поддержания культуры является хранение в жидком замороженном состоянии при –70°C. Погруженную культуру для замораживания получали в два этапа; в жидкую питательную среду засеивали колонию с чашки Петри.

Оптимизацию условий культивирования штамма проводили на основе зависимости целевой биосинтетической активности от состава питательных сред и параметров инкубирования. Жидкие среды для роста и биосинтеза включают один или несколько источников углерода, азота, минеральные соли и витамины. Был проанализирован широкий спектр источников углерода: моносахариды, дисахариды, полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты; азота: неорганические соли, дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, гидролизаты казеина, аминокислоты; витаминов и микроэлементов: целые клетки дрожжей, дрожжевые экстракты и автолизаты.

Предпочтительными источниками углерода являются длинноцепочечные углеводы – крахмалы, а также продукты их частичного гидролиза. Установлено, что использование растворимого картофельного крахмала наиболее перспективно в сравнении с крахмалами других видов – кукурузным, тапиоковым, гороховым и др. При увеличении концентрации вносимого крахмала от 25 до 90 г/л выход такролимуса увеличивался в 5 раз. Замена крахмала другими источниками углерода приводила к значительному снижению целевой биосинтетической активности. Изучение влияния на биосинтез такролимуса культурой ряда сахаров, вносимых в среду с крахмалом, выявило стимулирующий эффект глюкозы.

В качестве источника азота наибольший положительный эффект на биосинтез FK-506 показан для кукурузного экстракта. Компонентом питательной среды может служить как лиофилизированный, так и жидкий кукурузный экстракт при увеличении концентрации последнего в 3 раза.

Активный биосинтез наблюдался при добавлении в среду целых клеток пекарских дрожжей, обеспечивающих поступление необходимых витаминов, макро- и микроэлементов. Показано стимулирующее действие солей марганца и некоторых аминокислот – предшественников пипеколиновой кислоты. Обязательным условием является добавление в среду для биосинтеза сорбента, предотвращающего деградацию такролимуса культурой-продуцентом. Отработан режим ферментации. Оптимальными условиями культивирования являются температура 24-25°C, pH 6,8-7,5 и высокая аэрация. Биосинтез проводили в течение 10-14 суток [5].

Полученные данные были апробированы при проведении биопроцесса на уровне колб и лабораторных ферментеров (аппараты с рабочим объемом 5 л). Достигнуто значительное содержание такролимуса, составившее 530 мг/л. Результаты могут быть использованы при создании технологии процесса биосинтеза такролимуса на пилотном и опытно-промышленном уровнях.

Список литературы:

1. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506) // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 98 (2). P. 497-507.
2. Патент РФ №2495937, 2012.
3. Пошехонцева В.Ю., Гулевская С.А., Донова М.В. Сравнительное изучение фено- и генотипических характеристик и идентификация штаммов *Streptomyces* spp. – продуцентов такролимуса // Журнал научного фонда «Биолог». 2014. Т. 3. С. 119-122.

4. Пошихонцева В.Ю., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Донова М.В. Естественная изменчивость *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и селекция высокоактивного продуцента такролимуса (FK506) // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С.749-750.
5. Пошихонцева В.Ю., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Фокина В.В., Донова М.В. Таксономия такролимус (FK506)-синтезирующего штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и влияние компонентов среды на активность продуцента // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С.746-748.

Биотрансформация модифицированных стероидов – основа нового способа получения дегидроэпиандростерона

Довбня Д.В., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.

Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

Дегидроэпиандростерон (3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-он, андростенолон, прастерон, ДГЭА) является одним из важнейших эндогенных стероидных гормонов человека, предшественником мужских и женских половых гормонов, а также регулятором разнообразных биологических функций. В фармацевтической промышленности ДГЭА используют как прекурсор для получения синтетических гормонов. Препараты, содержащие ДГЭА, применяют в геронтологической практике для профилактики дегенеративных изменений нервной системы, минерального и углеводного обмена веществ. Традиционные способы производства ДГЭА основаны на многостадийном (более 5 стадий) химическом синтезе из диосгенина – индивидуального сапогенина, получаемого из биомассы растений р. *Dioscorea*.

Биотрансформация растительных стероидов является эффективным способом получения ряда стероидных прекурсоров с 3-кето-4-ен-конфигурацией стероидного ядра, которые, однако, не могут быть эффективно превращены в ДГЭА. Наиболее распространенные в природе и коммерчески доступные растительные стероиды (β -ситостерин, кампестерин, стигмастерин) являются полными аналогами ДГЭА по структуре стероидного ядра и содержат алифатическую боковую цепь при С-17, которая может быть окислена до 17-кето-группы различными бактериальными культурами. Трудности с получением ДГЭА из стероидов методом биотрансформации связаны с особенностью катаболических путей всех известных биокатализаторов, преобразующих 3 β -гидрокси-5-ен-конфигурацию стероидного ядра стероидов в 3-кето-4-ен-конфигурацию, в результате чего происходит потеря центра оптической изомерии субстрата при С-3. Ранее проведенные нами исследования позволили установить возможность защиты центра оптической изомерии при С-3 и структуры двойных связей эргостерина от их биохимической модификации микобактериями путем алкоксилирования гидроксигруппы субстрата [1] с получением продукта группы дельтаноидов. Изучение особенностей биотрансформации химически модифицированных растительных стероидов создает основы для понимания регуляции процесса и разработки альтернативных способов получения 3-гидроксистероидов.

Целью данной работы было изучение возможности и особенностей микробиологической трансформации смеси дериватов растительных стероидов, несущих

химическую защиту кислородного заместителя в положении С-3. С практической точки зрения, ценность работы заключается в установлении возможности получения ДГЭА из фитостерина. На начальном этапе данной работы была получена серия дериватизованных диметоксиметаном образцов фитостерина (Ф) различного происхождения и стеринавого состава (Табл. 1). Хроматографический анализ и ¹Н-ЯМР-спектроскопия продуктов дериватизации (МФ) показали образование метокси-О-метильных эфиров соответствующих стеринаов приблизительно в исходном соотношении, содержание непрореагировавших стеринаов не превышало 0,75%.

Полученные сложные субстраты были подвергнуты биотрансформации тремя культурами *Mycobacterium* spp. Показано, что биотрансформация смеси дериватизованных стеринаов имеет конвергентный характер, приводит к деградации боковой цепи субстратов при С-17 и образованию преимущественно одного продукта. Структура продукта (Рис. 1) была подтверждена методом ¹Н-ЯМР-спектроскопии как 3-метоксиметокси-андрост-5-ен-17-он (МДГЭА). Наибольшую скорость накопления МДГЭА наблюдали при использовании культур *Mycobacterium neoaurum*. Было показано, что эффективность биотрансформации снижается при увеличении в исходном субстрате содержания примеси 5(6)-насыщенных стеринаов в ряду МХол - МФ1 - МФ2 - МФ3 (Табл. 1).

Таблица 1

Субстраты:	Холестерин	Ф1	Ф2	Ф3
Производитель	Serva, Германия	Vita-solar Bio- technology, КНР	Jiang Su Spring Fruit B. P., КНР	Kaukas OY, Финляндия
Происхождение	Животный жир	Соевое масло	Соевое масло	Талловое масло
Стерины и аналоги, %	98,0	95,9	95,5	96,7
⁵⁽⁶⁾ Δ ⁵ -Стерины, %	98,0	95,9	93,9	82,3
Дериваты:	МХол	МФ1	МФ2	МФ3
Темп. плавления, °С	82,9 – 84,0	67,3 – 71,1	71,3 – 74,05	63,6 – 66,2
Мольный выход МДГЭА, %	64,3	61,2	58,4	45,2

Была изучена возможность регенерации гидроксигруппы при С-3 у продукта биотрансформации и предложен простой одностадийный метод снятия химической защиты в водно-органической двухфазной среде. Методами ВЭЖХ и ¹Н-ЯМР-спектроскопии показано, что продукт реакции содержит 3β-гидрокси-группу, т.е. сохраняет исходную ориентацию заместителя при С-3, и представляет собой ДГЭА.

Режим биопроцесса и различные условия химических стадий были оптимизированы, что позволило получить мольный выход ДГЭА из Ф 30%. Биопроцесс был масштабирован до уровня лабораторных ферментеров.

Таким образом, показана принципиальная возможность окисления боковой цепи при С-17 у смеси О-метоксиметилированных растительных стеринаов микобактериями. Показан конвергентный характер биотрансформации, протекающей с сохранением заместителя при С-3 и общей конфигурации стероидного ядра субстрата. ДГЭА впервые получен из фитостерина: предложен комбинированный трехстадийный метод получения ДГЭА на основе биопроцесса в лабораторных ферментерах.

Рис. 1. Предложенная схема получения ДГЭА из фитостерина

Список литературы:

1. Dovbnya, D.V., Egorova, O.V., Donova, M.V. Microbial side-chain degradation of ergosterol and its 3-substituted derivatives: a new route for obtaining of deltanoids. *Steroids*, 75 (2010), pp. 653-658.

Полногеномный биоинформатический анализ генов стероидного катаболизма штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

**Штратникова В.Ю.¹, Щелкунов М.И.², Фокина В.В.³,
Суходольская Г.В.³, Донова М.В.³**

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ

² Институт проблем передачи информации РАН

³ Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН

Штамм *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д способен проводить важные реакции трансформации стероидов: 1(2)-дегидрирование 3-кетостероидов, гидролиз ацетилированных стероидов, восстановление карбонильных групп при С-17 и С-20 андростанов и прегнанов, соответственно, а также деградацию стеринов и андростанов. Однако, полногеномные исследования стероидтрансформирующих представителей семейства *Nocardioideaceae*, а также близкородственных актинобактерий до начала наших исследований не проводились.

В предыдущем исследовании нами была определена полная нуклеотидная последовательность хромосомной ДНК *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, и осуществлена сборка кольцевой хромосомы. Установлено, что размер генома составляет 5.6 м.п.н., содержание GC-пар — 72.66%. В кольцевой хромосоме аннотировано около 5420 белок-кодирующих последовательностей [1].

В настоящем исследовании мы анализировали оперонную структуру генов, предположительно участвующих в катаболизме стероидов.

Как известно, деградация стероидного катаболизма у актинобактерий контролируется двумя транскрипционными репрессорами TetR-типа, - KstR и KstR2 [2, 3]. В качестве

основного инструмента поиска кандидатных генов, участвующих в катаболизме стероидов, использовали сайты связывания с KstR-регуляторами.

Штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д культивировали как описано ранее [4] на минеральной среде с β -ситостерином или холестеринем (1 г/л). Определение стероидов проводили, как описано в [5]. Автоматическую аннотацию генома проводили с помощью онлайн сервисов XBASE, RAST и программы PGAP (GenBank). Для анализа ортологических и паралогических взаимоотношений между генами *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д и другими актинобактериями использовали программу OrthoMCL 2.09. Белки *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817Д (GenBank: CP009914), *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д (GenBank: CP006936), *Gordonia neofelifaecis* NRRL В-59395 (скаффолды сборки, GenBank: NZ_AEUD00000000), *M. smegmatis* MC2 155 (GenBank: NC_018289), *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank: AL123456), *R. erythropolis* PR4 с плазмидами (GenBank: NC_012490; NC_007486, NC_007487, NC_007491), *R. jostii* RHA1 с плазмидами (GenBank: NC_008268; CP000432, NC_008270, NC_008271) объединяли в ортологические группы. Также для поиска кандидатных генов, кодирующих ферменты стероидного катаболизма, использовали программу BLASTx. Опероны, содержащие найденные гены, рассчитывали с помощью интернет-сервиса FgenesB. Определяли мотивы связывания KstR и KstR2 *de novo* с помощью программы MEME 4.10, проводя поиск в участках в 500 п.н. до и 50 п.н. после старт-кодона генов, гомологичных генам, отвечающих за катаболизм стероидов у других видов. С помощью полученных мотивов был проведён поиск всех потенциальных сайтов связывания KstR и KstR2 в аналогичных областях относительно старт-кодона всех генов генома с помощью программы FIMO из набора программ MEME Suite 4.10. В качестве предположительных сайтов связывания рассматривались сайты с долей ложноположительных ошибок (q-value) менее 0.01. Те же участки были просканированы программой UGENE 1.13.1 с использованием соответствующих микобактериальных KstR и KstR2; рассматривались сайты с параметром качества не менее 85% от максимально возможного. При дальнейшем анализе использовали сайты связывания, выявленные обеими программами одновременно.

Мотивы связывания KstR и KstR2, рассчитанные для *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д *de novo*, практически совпали с микобактериальными (*M. tuberculosis* и *M. smegmatis*). Предсказанные опероны, включающие ортологи известных генов стероидного катаболизма, были объединены в кластеры А, В, С, D, Е. Рассчитанные сайты связывания KstR-регуляторов были обнаружены в трёх крупных кластерах: А (KR76_14160—KR76_14505), В (KR76_12190—KR76_12345), С (KR76_25015—KR76_25200). Большинство генов из кластеров А и В имеют рассчитанные сайты связывания KstR, в то время как гены кластера С - KstR2. Известно, что гены регулона KstR2 участвуют в деградации колец С и D. Предсказанный регулон KstR2 у *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д находится в кластере А и состоит из генов, ортологичных генам подобного регулона у *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Кластеры D (KR76_27035—KR76_27130) и Е (KR76_17995—KR76_18070) включают ортологи известных генов стероидного катаболизма, однако при этом не имеют предположительных сайтов связывания KstR-регуляторов.

При инкубировании *N. simplex* на минеральной среде со стеринами обнаружено накопление соответствующих стенонов, что свидетельствует о модификации 3 β -ол-5-ен- в 3-кето-4-ен-структуру в кольце А стероидного ядра. Эта реакция считается начальным этапом окисления стероидов актинобактериями. Ферментами, отвечающими за окисление 3 β -гидрокси-группы и $\Delta^{5\rightarrow 4}$ -изомеризацию, являются холестериноксидазы и/или 3 β -гидрокси-стероиддегидрогеназы (3-ГСД). В исследуемом штамме обнаружена

холестериноксидаза *KR76_09550*, имеющая предположительный сайт связывания KstR. В геноме не найдены гены с высокой идентичностью к 3-ГСД. Поскольку штамм осуществляет окисление холестерина с высокой эффективностью, можно предположить, что за этот процесс отвечает *KR76_09550*. Штамм способен утилизировать холестерин/ситостерин, что может предполагать наличие генов ферментов деградации боковой цепи стероидов; раскрытия кольца В: 3-кетостероиддегидрогеназы (3-КСД) и 9 α -гидроксилазы; а также ферментов, отвечающих за дальнейшее окисление образующегося 9(10)-секостероида. Поскольку *N. simplex* VKM Ac-2033D является эффективным биокатализатором, осуществляющим 1(2)-дегидрирование 3-кетостероидов андростанового и прегнанового рядов, особый интерес представляли гены, кодирующие 3-КСД, а также ферменты, проводящие восстановление карбонильных групп при C-17 андростанов и C-20 прегнанов. Было найдено 5 кандидатных генов, кодирующих 3-КСД, из которых только два предположительно регулируются KstR (*KR76_14500* в кластере А, *KR76_02655* вне кластеров). Ортолог *hsd4A* *KR76_12260* находится в кластере В в предсказанном опероне с предположительным сайтом связывания KstR; продукт гена *hsd4A* может работать как 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа, а также участвовать в деградации боковой цепи холестерина. Ортолог гена 3 α (20 β)-гидроксистероиддегидрогеназы *KR76_25085* расположен в регулоне кластера С, включающего ортологи генов, кодирующих ферменты деградации колец C/D, и имеет рассчитанный сайт связывания KstR2.

Биоинформатический анализ генома *N. simplex* VKM Ac-2033D позволил выявить кандидатные гены, кодирующие ферменты системы транспорта стероидов в клетку, деградации алифатической боковой цепи при C17, расщепления колец A/B и C/D. Основные особенности генома штамма включают наличие предсказанного регулона KstR2, не имеющего аналогов у других аннотированных геномов актинобактерий, отсутствие генов, кодирующих 3-ГСД и отсутствие ортологов *chsE1* (*fadE28*). Результаты данного исследования проясняют способность *N. simplex* VKM Ac-2033D трансформировать различные стероидные субстраты и могут быть использованы при генетической модификации штаммов. Для подтверждения значимости кандидатных генов в катаболизме стероидов проводятся транскриптомные исследования.

Работа поддержана Российским научным фондом (14-24-00169) и Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-31089).

Список литературы:

1. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Fokina V.V., Logacheva M.D., Sokolov S.L., Bragin E.Y., Ashapkin V.V., Donova M.V. Complete genome sequence of steroid-transforming *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D Genome Announc. 2015. V. 3. № 1.
2. Kendall S.L., Withers M., Soffair C.N., Moreland N.J., Gurcha S., Sidders B., Frita R., Ten Bokum A., Besra G.S., Lott J.S., Stoker N.G. A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2007;65(3):684-99.
3. Kendall S.L., Burgess P., Balhana R., Withers M., Ten Bokum A., Lott J.S., Gao C., Uhia-Castro I., Stoker N.G. Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. Microbiology. 2010 May;156(Pt 5):1362-71.
4. RU патент 2480475 2013.
5. Ivashina T.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Donova M.V. Cholesterol oxidase ChoD is not a critical enzyme accounting for oxidation of sterols to 3-keto-4-ene steroids in fast-growing *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012;129: 47-53.

Трансформация прегненолона в 11 α -гидроксипрогестерон мицелиальными грибами

Коллеров В.В., Шутов А.А., Донова М.В.

Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

Гормональную активность 11 α -гидроксипрогестерона, связанную с регуляцией углеводного обмена в организме человека, обуславливает наличие в структуре стероида гидроксильной группы в положении С-11. Способы получения 11 α -гидроксипрогестерона из прогестерона с использованием различных микроорганизмов, в частности, мицелиальных грибов рода *Aspergillus* и *Rhizopus* широко представлены в литературе (Shibahara et al., 1979; Zakej-Mavric and Belic, 1987; Fernandes et al., 2003). Между тем, способность к образованию 11 α -гидроксипрогестерона из прегненолона - предшественника прогестерона, остается практически не изученной, хотя именно такой подход обладает преимуществом, так как позволяет совместить в одной биотехнологической стадии реакции окисления 3-гидроксигруппы, Δ^5 - Δ^4 изомеризации и 11 α -гидроксилирования, что является экологически и экономически привлекательным, поскольку исключает несколько стадий химического синтеза.

Цель данной работы заключалась в изучении способности мицелиальных грибов катализировать трансформацию прегненолона в 11 α -гидроксипрогестерон с последующей оптимизацией процесса биоконверсии наиболее активной культурой.

В ходе проведения работы 77 штаммов мицелиальных грибов различного таксономического положения были протестированы в отношении прегненолона (0.5 г/л). Способность катализировать конверсию прегненолона была выявлена для 60 штаммов - представителей родов *Absidia*, *Acremonium*, *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Backusella*, *Beauveria*, *Bipolaris*, *Chaetomidium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Nectria*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Scopulariopsis*, *Sordaria* и *Thielavia*. Представителю родов *Acremonium*, *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Chaetomidium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nectria*, *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* и *Sordaria* (19 штаммов) окисляли прегненолон до прогестерона, что свидетельствовало о наличии у них 3 β -гидроксистероид дегидрогеназной/ Δ^5 - Δ^4 -изомеразной активности. Последующая трансформация накопленного прогестерона в 11 α -гидроксипрогестерон за счет 11 α -гидроксилазной активности была выявлена для штаммов *Acremonium arxii* ВКМ F-2717, *Acremonium biseptum* ВКМ F-2899, *Curvularia inaequalis* ВКМ F-3289, *Rhizopus stolonifer* ВКМ F-401, *Scopulariopsis brumpti* ВКМ F-415 и среди трех представителей рода *Aspergillus*. Следует отметить, что культуры *Acremonium domschii* ВКМ 2819, *Actinomucor elegans* ВКМ F-492, *Fusarium* sp. МТОС F-162, *Scopulariopsis asperula* ВКМ F-760 и *Scopulariopsis brevicaulis* ВКМ F-2409, активно катализирующие окисление 3 β -гидрокси-5-ен группировки прегненолона с образованием прогестерона, тем не менее не проводили его дальнейшего 11 α -гидроксилирования.

Сравнительный анализ трансформационных активностей отобранных грибных культур позволил выявить штамм *Aspergillus niger* ВКМ F-212 в качестве наиболее активного биокатализатора трансформации прегненолона в 11 α -гидроксипрогестерон (биоконверсия превышала 50%).

После 60 ч инкубации мицелия *Aspergillus niger* ВКМ F-212 с прегненолоном (0.5 г/л) было обнаружено 4 продукта. На основании данных ТСХ и ВЭЖХ анализов обнаруженные метаболиты были идентифицированы как прогестерон (R_t 11.04), 11 α -гидроксипрогестерон (R_t 4.39), 11 α ,17 α -дигидроксипрогестерон (R_t 3.34) и 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерон (R_t 2.89). Основным продуктом биоконверсии являлся 11 α -гидроксипрогестерон, выход которого достигал 52%; в то время как содержание каждого из остальных производных к концу трансформации не превышало в сумме 15% (рис. 1).

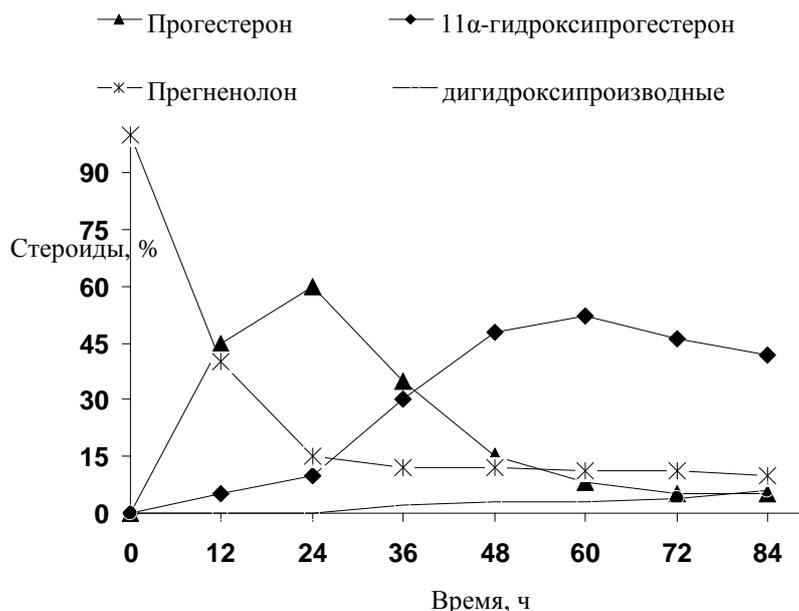


Рис. 1. Динамика биоконверсии прегненолона культурой *Aspergillus niger* ВКМ F-212

Оптимизация условий трансформации была направлена на получение мелкого гомогенного мицелия и увеличение доступности стероидного субстрата ферментным системам грибной культуры и включала: а) оптимизацию состава среды; б) оптимизацию времени внесения субстрата; в) изучение влияния солубилизирующих агентов (β -циклодекстрина и его метильного и оксипропильного производных); г) исследование влияния неионогенных ПАВ. Установлено, что использование трансформационной среды, содержащей глюкозу (50 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л), соли магния (5 г/л), метил- β -циклодекстрин (мольное соотношение к субстрату 1.5/1.0) с добавлением Твин 80 (0,1%) обеспечивает двукратное увеличение выхода 11 α -гидроксипрогестерона (до 70%) при нагрузке субстрата 3 г/л.

Полученные результаты могут служить основой для создания нового метода получения 11 α -гидроксипрогестерона из прегненолона.

Работа была поддержана грантом РНФ (соглашение № 14-24-00169).

Список литературы:

1. Shibahara M, Moody JA, Smith LL. Microbial hydroxylations. V. 11 α -hydroxylation of progesterone by cell-free preparations of *Aspergillus ochraceus*. Biochim. Biophys. Acta 1979;202:172-179.

2. Zakelj-Mavric M, Belic I. Hydroxylation of steroids with 11 alpha-hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. J Steroid Biochem. 1987;28:197-201.
3. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments Enzyme and microbial technology 2003;32:688-705.

Метаболическая гибкость *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z открывает новые биотехнологические перспективы метанотрофов

Бут С.Ю.^{1,2}, Калюжная М.Г.³

¹Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

²University of California, San Diego; ³San Diego State University

Метанотрофы – высокоспециализированная группа прокариот, использующих метан в качестве единственного источника углерода и энергии. До недавнего времени считалось, что метанотрофы получают энергию для роста с помощью прямого окисления метана до углекислого газа, сопряженного с кислородным дыханием. Углерод CH₄ при этом фиксируется на уровне формальдегида в рибулозимонофосфатном (РМФ) пути (метанотрофы I типа) или сериновом цикле (метанотрофы II типа) (Trotsenko, Murell, 2008). Однако недавнее открытие у метанотрофов I типа ферментации в микроаэробных условиях (Kalyuzhnaia et al., 2013), позволяет пересмотреть метаболический дизайн данной группы микроорганизмов. В качестве модельного объекта был выбран галотолерантный алкалофильный метанотроф *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, ввиду простоты культивирования и стабильности данного штамма, а также наличия секвенированного генома и отработанных методик генетических манипуляций.

Первоочередной задачей было выяснить, как культура, реализующая кислородное дыхание, переключается на ферментацию. Нами был получен мутант по гену *bhr*, кодирующему бактериогемэритрин, экспрессия которого изменялась максимальным образом при понижении концентрации кислорода в среде. Ранее выдвигалась гипотеза о том, что функция белка Bhr заключается в связывании и транспорте кислорода к мембрансвязанной метанмонооксигеназе (мММО) (Chen et al., 2012). Однако обнаружено, что скорость потребления метана клетками мутантного штамма Δ*bhr* соответствовала таковой у клеток дикого типа. При этом мутант экскретировал ацетат даже при высокой концентрации кислорода, а в микроаэробных условиях продукция органических кислот у мутанта была значительно выше, чем у штамма дикого типа (Табл. 1). Повышенная экскреция ацетата также обнаружена у мутантов по компонентам дыхательной цепи – цитохром *c* оксидазе (Δ*cox*) и цитохрому *bc* (Δ*petA*). Данные факты указывают на то, что бактериогемэритрин служит для доставки кислорода не к мММО, как предполагалось ранее (Chen et al., 2012), а к компонентам дыхательной цепи. Именно лимитирование дыхательной цепи (как из-за низкой концентрации кислорода, так и вследствие нарушения механизма доставки молекул O₂) приводит к накоплению в клетке избыточного количества восстановительных эквивалентов НАДН₂ и переходу культуры к ферментации.

Таблица 1

Содержание в среде продуктов ферментации, экскретируемых исходной культурой *M. alcaliphilum* 20Z и мутантными штаммами (мкмоль/г сухих клеток)

Штамм	Ацетат		Лактат	
	dO ₂ > 20%	dO ₂ < 1%	dO ₂ > 20%	dO ₂ < 1%
20Z	следы	0,02	nd	0,0038
Δbhr	41,4	270	nd	14,4
Δsox	н/о	764	н/о	nd
ΔpetA	н/о	692	н/о	nd

В аннотированных геномах гаммапротеобактериальных метанотрофов, включая *M. alcaliphilum* 20Z, обнаружены гены фосфокетолазы – фермента, катализирующего образование C₂-соединений (ацетил-КоА) напрямую из первичных продуктов C₁-ассимиляции – фруктозо-6-фосфата или ксилулозо-5-фосфата. Реализация фосфокетолазного пути позволила бы метанотрофам более эффективно ассимилировать CH₄ до центрального интермедиата – ацетил-КоА, минуя потерю углерода в виде CO₂ при окислительном декарбоксилировании пирувата. Для подтверждения функционирования фосфокетолазного пути нами был инактивирован пируватдегидрогеназный комплекс и получен мутант Δpdh с нарушением основного пути синтеза ацетил-КоА. Штамм Δpdh демонстрировал замедленный рост и высокую продукцию пирувата (до 700 мкмоль/г клеток), что открывает перспективы применения данного мутанта для получения пирувата из метана. Примечательно, что добавление в среду 1 мМ ацетата приводило к увеличению скорости роста культуры, но снижало в 10 раз экскрецию пирувата. Данный «ацетатный переключатель» может быть использован в качестве своеобразного регулятора ферментации, позволяя на начальной стадии использовать субстрат только для наращивания биомассы, а по достижении культурой определенной плотности переводить клетки в режим биокатализа с высокой эффективностью трансформации метана в целевой продукт.

Кроме того, инактивация генов, кодирующих ацетаткиназу и лактатдегидрогеназу, т.е. нарушение путей синтеза основных продуктов ферментации, приводила к появлению в культуральной жидкости новых соединений – этанола и сукцината, что свидетельствует о метаболической гибкости метанотрофа и открывает широкие перспективы использования мутантных штаммов *M. alcaliphilum* в качестве биокатализаторов.

Дальнейшая генетическая модификация штамма-производителя Δpdh позволит перенаправить потоки углерода на синтез различных целевых продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-14-01045).

Список литературы:

1. Trotsenko YA and JC Murrell. Metabolic aspects of obligate aerobic methanotrophy. Adv. App. Microbiol. 2008. 63. 183-229.

2. Kalyuzhnaya MG, Yang S, Rozova ON, Smalley NE, Clubb J, Lamb A, Gowda GA, Raftery D, Fu Y, Bringel F, Vuilleumier S, Beck DA, Trotsenko YA, Khmelenina VN, Lidstrom ME. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. *Nat Commun.* 2013; 4:2785.
3. Chen KH, Wu HH, Ke SF, Rao YT, Tu CM, Chen YP, Kuei KH, Chen YS, Wang VC, Kao WC, Chan SI. Bacteriohemerythrin bolsters the activity of the particulate methane monooxygenase (pMMO) in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Inorg Biochem.* 2012 Jun;111:10-7.

Потенциальные функции ХохF в биодegradации дихлорметана у аэробных метиловобактерий

Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Троценко Ю.А.

Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

Дихлорметан (CH_2Cl_2 , ДХМ) – преимущественно антропогенное высокотоксичное канцерогенное соединение, являющееся опасным загрязнителем окружающей среды вследствие летучести, хорошей растворимости в воде, персистентности и больших объемов промышленного производства. Ряд аэробных метиловобактерий способны использовать ДХМ в качестве единственного источника углерода и энергии, осуществляя его первичное дегалогенирование с помощью хорошо изученного специфического фермента – дихлорметандегалогеназы. Формальдегид, который при этом образуется, является естественным метаболитом метилотрофов и может служить источником C_1 -единиц для биосинтеза клеточных компонентов. Вместе с тем оказалось, что для биодegradации CH_2Cl_2 необходимы не только ДХМ-дегалогеназы и стандартные метилотрофные модули (C_1 -окисление и C_1 -ассимиляция), но и комплекс неизвестных белков/генов, обеспечивающих защиту клеток от стресс-факторов, сопутствующих дегалогенированию (продукция генотоксичных интермедиатов – S-хлорметилглутатиона и формальдегида, а также HCl).

Нами обнаружено, что при росте на ДХМ аэробных метилотрофных деструкторов *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, *Methylophila helvetica* DM6 и *Albibacter methylovorans* DM10 в спектрах поверхностных мембранных белков клеток наряду с альфа-субъединицей метанолдегидрогеназы (MxaF, MextDM4_METDI5145) присутствует гомологичная ей (~50% идентичности) предполагаемая PQQ-зависимая метанол/этанол дегидрогеназа (XохF, MextDM4_METDI2492). Поскольку активация экспрессии гена *хоxF* ранее была продемонстрирована для ряда метиловобактерий при росте на метиламине (род *Methylothera*), диметилсульфиде (*Methylophaga*), а также при колонизации аэрируемых частей растений (*Methylobacterium*), мы предположили, что белок ХохF индуцируется в ответ на воздействие различных стрессоров и принимает участие в адаптивных процессах.

Целями данной работы были оценка распространения предполагаемой PQQ-зависимой метанол/этанол дегидрогеназы ХохF у аэробных метиловобактерий-деструкторов CH_2Cl_2 и выяснение ее функциональной роли при росте на ДХМ и метаноле.

С помощью разработанной нами системы вырожденных олигонуклеотидных праймеров были выявлены и секвенированы ортологи гена *хоxF Mb. dichloromethanicum* DM4 у всех тестированных деструкторов ДХМ различного таксономического положения: *Mp. helvetica* DM9^T, *A. methylovorans* DM10^T, *Methylophilus leisingeri* DM11^T, *Paracoccus methylutens* DM12^T, *Methylorhabdus multivorans* DM13^T, *Methylorhabdus* sp. DM15, *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16^T, *Methylobacterium extorquens* DM17. Результаты

филогенетического позиционирования штаммов на основании транслированных аминокислотных последовательностей секвенированных фрагментов *хохF* согласуются с таковыми для белка MxaF, используемого как филогенетический маркер метилотрофов.

Модельным объектом для исследования функциональности гена *хохF* служил деструктор *Mb. dichloromethanicum* DM4, так как для него доступен полностью секвенированный и частично аннотированный геном, в котором присутствует только один гомолог гена *хохF*. С использованием мобилизуемого суицидного вектора pK18mob нами получен нокаут-мутант *Mb. dichloromethanicum* DM4 с инактивированным геном *хохF*, содержащим одновременно делецию кодирующей последовательности длиной 447 п.н. и инсерцию маркерного гена устойчивости к гентамицину. Мутант DM4 Δ *хохF* утратил способность к росту на среде с метанолом, но был способен расти на метиламине, формиате, ДХМ, а также на полиуглеродных субстратах (сукцинат и пируват). При этом в бесклеточных экстрактах штамма DM4 Δ *хохF*, выращенного на минеральной среде «ММ» с сукцинатом в присутствии метанола, отсутствовали активность метанолдегидрогеназы (МДГ) и белок MxaF. Для проверки предположения о блокировании экспрессии на уровне *txa*-промотора, в исходный (DM4 wt) и мутантный (DM4 Δ *хохF*) штаммы была перенесена плазида pCM160 с клонированным в ней геном зеленого флуоресцентного белка *gfp* под контролем промотора МДГ. При этом нами обнаружено существенное снижение (>98%) относительной флуоресценции клеток трансконъюганта DM4 Δ *хохF*/pCM160*gfp* по сравнению с трансконъюгантом DM4 wt/pCM160*gfp* (1393 и 78163 относительных единиц флуоресценции/ОП, соответственно), свидетельствующее, что неспособность мутанта DM4 Δ *хохF* расти на метаноле обусловлена потерей экспрессии гена *txaF*. Это согласуется с результатами, полученными ранее для Δ *хохF* мутанта близкородственной метиловобактерии *Mb. extorquens* AM1. Кроме того, сравнительный анализ белковых профилей клеток, выращенных на сукцинате в присутствии метанола, продемонстрировал отсутствие у мутантного штамма индукции белка с M_r мономеров ~40 кДа, масс-спектрометрически идентифицированного как серин-гликозилат-аминотрансфераза (SgaA, MextDM4_METDI2478).

Инактивация гена *хохF* повлияла и на адаптацию клеток *Mb. dichloromethanicum* DM4 к использованию ДХМ. После культивирования на сукцинате мутант DM4 Δ *хохF* характеризовался существенно меньшей скоростью роста на CH_2Cl_2 по сравнению с исходным штаммом. Однако при последующих пассажах, когда перестройка метаболизма для использования ДХМ была завершена, мутантный штамм практически не отличался от исходного по скорости роста. Нами показано, что при переносе на CH_2Cl_2 клеток исходного и мутантного штаммов, выращенных на сукцинате до середины экспоненциальной фазы роста, скорость экспрессии их ДХМ-дегалогеназ и динамика концентрации ионов хлора в среде не различаются между собой. Напротив, при переносе на ДХМ клеток в стационарной фазе роста активность ДХМ-дегалогеназы в экстрактах клеток и концентрация ионов хлора в среде культивирования у мутанта DM4 Δ *хохF* были почти в 1,5 раза ниже, чем у клеток дикого типа. Мы предполагаем, что клетки обоих штаммов, выращенные до стационарной фазы роста, испытали на себе воздействие ряда неспецифических стрессовых факторов (голодание и т.п.), однако у клеток дикого типа экспрессия белков стресс-ответа, по-видимому, происходила эффективнее, нежели у мутанта DM4 Δ *хохF*, способствуя перекрестной адаптации к использованию токсичного CH_2Cl_2 . Слабый адаптивный ответ у мутанта DM4 Δ *хохF*, напротив, может вынуждать клетки использовать свои ресурсы в первую очередь для выживания в условиях стрессов, и лишь затем – для синтеза ДХМ-дегалогеназы. При сравнительной оценке устойчивости

мутанта DM4 Δ хоxF и исходного штамма DM4 wt к воздействию различных типов стрессоров нами установлено, что мутантный штамм более чувствителен к повышенной концентрации хлорида натрия, тепловому шоку, этанолу, перекиси водорода, формальдегиду и додецилсульфату натрия, нежели штамм дикого типа.

В целом, результаты нашей работы свидетельствуют, что белок ХохF необходим *Mb. dichloromethanicum* DM4 для роста на метаноле, при переключении метаболизма с использования полиуглеродных субстратов на C₁-соединения, а также для активации адаптивного ответа при воздействии стрессоров. Учитывая присутствие этого белка на поверхности клеток и предсказанную для него с помощью алгоритмов PSOTRb, CELLO, НММ-ТМ и DAS периплазматическую локализацию с наличием трансмембранных доменов, вполне возможно, что он выполняет функцию сенсора в сложном регуляторном каскаде, требуемом для экспрессии генов C₁-метаболизма у метилотрофов. В свете многообразия предполагаемых функций гена *хоxF* для детального ответа на интригующий вопрос о его роли при метилотрофном росте необходимы дальнейшие исследования.

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

Колонизация метиловобактериями повышает антиоксидантную защиту растений в условиях окислительного стресса

Агафонова Н.В.^{1,2}, Доронина Н.В.¹, Троценко Ю.А.¹

¹Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ

²Пущинский государственный естественно-научный институт

Многие метиловобактерии являются фитосимбионтами, потребляют C₁-соединения – продукты метаболизма растений – и реализуют различные стратегии влияния на рост растений. Изучение механизмов влияния аэробных метиловобактерий на растения расширяет и углубляет знания об основах их «диалога» и дает основание судить о перспективности использования метилотрофных фитосимбионтов для агробиотехнологии.

Цель работы – анализ влияния колонизации растений метиловобактериями на их устойчивость к окислительному стрессу, индуцированному гербицидом паракватом.

Гнотобиотические растения гороха (*Pisum sativum* L.), колонизированные аэробными метиловобактериями четырех различных таксонов (*Methylobacterium extorquens* G10, *Methylobacillus arboreus* Iva, *Methylophilus flavus* Ship, *Methylopila musalis* MUSA), подвергали окислительному стрессу, индуцированному паракватом (5мкМ), в качестве контроля использовали неколонизированные (стерильные) растения.

Показано, что и колонизированные, и стерильные растения оказались восприимчивыми к воздействию стресса, вызванного паракватом. Об этом свидетельствовало повышение активностей фермента супероксиддисмутазы (в 1,5-2 раза), который является первой линией защиты от активных форм кислорода. Содержание токсичного для клеток пероксида водорода – продукта дисмутации супероксид-аниона в клетках – у растений, инокулированных метиловобактериями, увеличивалось до 1,5 раз. В ответ возрастали уровни активностей каталазы и пероксидаз, т.к. H₂O₂ является сигнальной молекулой для активации этих ферментов. В листьях неколонизированных растений, содержание H₂O₂ достоверно не изменялось, но оставалось на высоком уровне, что подтверждалось высокой активностью каталазы, которая эффективно работает при

высоких концентрациях H_2O_2 , в то время как пероксидазы – при невысоком ее уровне. Эти данные подтверждали, что активные формы кислорода, обладая высокой реакционной способностью, нарушали биохимические процессы в клетках растений и влияли на такие важные структуры как клеточные мембраны.

Однако колонизация растений гороха метиловыми бактериями снижала негативное действие параквата, что подтверждалось низким содержанием ключевого показателя повреждения клеточных мембран растений – малонового диальдегида (в 1,5-3 раза ниже, чем в варианте со стерильными растениями). Кроме того, в ответ на неблагоприятные изменения условий среды, растения накапливают пролин – низкомолекулярный метаболит-антиоксидант, обладающий полифункциональным защитным действием. Содержание пролина после стресса у колонизированных растений повысилось в 1,5-1,7 раза, но было ниже концентрации пролина в листьях неколонизированных растений. Так как высокий уровень пролина наблюдается у стрессированных растений, эти данные подтверждают положительный эффект колонизации.

Постоянство соотношения суммарного содержания хлорофиллов к каротиноидам и хлорофиллов a/b у растений свидетельствует о неизменности стехиометрического соотношения между комплексами реакционных центров фотосистем I и II (ФС I и II) и светособирающего комплекса ФС II. У стерильных растений после окислительного стресса отмечали уменьшение соотношения $chl(a+b)/каротиноиды$ в 3,5 раза, а $chl a/b$ – почти в 1,5 раза, что свидетельствовало о негативном влиянии параквата на работу ФС I и II у неколонизированных растений. Для колонизированных метиловыми бактериями листьев растений эти показатели практически не изменялись, что указывало на стабильность соотношения между комплексами фотосистем и сохранение оптимальных условий светосбора в ФС II.

Таким образом, показано, что до стрессового воздействия растения, колонизированные метиловыми бактериями, находились в более стабильном состоянии, по сравнению с неколонизированными, о чем свидетельствовали низкие уровни активностей антиоксидантных ферментов, перекисного окисления липидов и высокая активность фотосинтетического аппарата. Колонизация растений гороха метиловыми бактериями снижала негативный эффект окислительного стресса по сравнению с неколонизированными растениями, что подтверждалось невысоким содержанием пероксида водорода, малонового диальдегида и стабильной работой фотосинтетического аппарата. Следовательно, установлено, что колонизация метиловыми бактериями различных таксонов существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному обработкой паракватом.

Полигидроксibuтират-синтазы представителей рода *Methylobacterium*: молекулярные аспекты

Замахаева С.А.^{1,2}, Федоров Д.Н.¹, Доронина Н.В.¹, Троценко Ю.А.¹

¹ Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ

² Пушчинский государственный естественно-научный институт

Полигидроксibuтират (ПГБ) – биodeградеableмый, биосовместимый, термопластичный полимер, который используется в медицине, сельском хозяйстве, а так

же в качестве упаковочного материала. ПГБ является естественным запасным веществом многих видов бактерий и активно нарабатывается при несбалансированных условиях роста. Высокая стоимость выделения полимера является существенным недостатком, т.к. субстратом для многих бактерий, запасующих ПГБ, является глюкоза. Но аэробные метиловобактерии, использующие метанол и другие C1-соединения в качестве источников углерода и энергии, перспективны для промышленного производства биополимера, ввиду дешевизны ростовых субстратов.

Генопротеомика метиловобактерий хорошо изучена, но актуальными остаются вопросы разнообразия и распространения генов биосинтеза полимера у представителей *Methylobacterium* и биохимические свойства ПГБ-синтаз.

Проведенный нами поиск генов, кодирующих вероятные ПГБ-синтазы, выявил наличие в геномах бактерий рода *Methylobacterium* множественных генов ПГБ-синтаз (до 5 генов) у одного штамма. В результате филогенетического анализа показано, что белки PhaC1, PhaC2, PhaC3 относятся к первому классу ПГБ-синтаз, однако они имеют низкий уровень аминокислотной идентичности с охарактеризованными синтазами из *Cupriavidus necator*. Белки PhaC4 относятся к ПГБ-синтазам 3 типа и PhaC5, по-видимому, представляют неохарактеризованный класс ПГБ-синтаз.

ПГБ-синтаза I класса PhaC1, представленная у всех штаммов *Methylobacterium*, является основным ферментом биосинтеза ПГБ. Чтобы понять роль дополнительных ферментов в биосинтезе ПГБ необходимо изучить их свойства. Для этого на основе pHUE были созданы экспрессионные векторы p7A-108, p7A-121, p7A-122, p7A-123, p7A-124 и p7A-125 с генами различных ПГБ-синтаз (*phaC1* (*M.extorquens* AM1), *phaC1* (*M. radiotolerans* JCM2831), *phaC2* (*M. nodulans* ORS2060), *phaC3* (*M.extorquens* DM4), *phaC4* (*M. radiotolerans* JCM2831) и *phaC5* (*M. nodulans* ORS2060)). Рекомбинантные белки PhaC, содержащие полигистидиновую метку на N-конце, выделяли из грубого клеточного экстракта методом металл-хелатной хроматографии. Электрофорезом в денатурирующем ПААГ установили молекулярную массу ферментов, которая составила 77,8 кДа для PhaC1 (AM1), 78,5 кДа для PhaC1 (JCM2831), 82,2 кДа для PhaC2, 78 кДа для PhaC3, 41,3 для PhaC4 и 48,7 кДа для PhaC5, что соответствует расчетным.

Были определены кинетические характеристики для ПГБ-синтаз PhaC1 (AM1) и PhaC1 (JCM2831). В качестве субстрата использовался 3-гидроксибутирил-КоА, скорость реакции определялась при длине волны 412 по скорости превращения ДТНБ в ТНБ. Константа Михаэлиса (K_m) для PhaC1 (AM1) составила 1,3 мМ, а максимальная скорость реакции (V_{max}) 0,1 мкмоль*мин⁻¹*мг⁻¹. Для PhaC1(JCM2831) $K_m=0,1$ мМ, и $V_{max} =12,3$ мкмоль*мин⁻¹*мг⁻¹.

Для ферментов PhaC2-PhaC5 была вычислена скорость реакции (мкмоль*мин⁻¹*мг⁻¹): $V_p(\text{PhaC2})=0,0021$, $V_p(\text{PhaC3})=0,0459$, $V_p(\text{PhaC4})=0,0337$, $V_p(\text{PhaC5})=0,0187$.

Таким образом, впервые определены кинетические характеристики ПГБ-синтаз метиловобактерий, кодируемых генами *phaC1*, выполняющих основную функцию в биосинтезе ПГБ. Установлено, что остальные паралоги ПГБ-синтаз, исследованные в данной работе, обладают низкой активностью.

Получены мутанты *M. extorquens* AM1 по гену *phaC1* и *M. extorquens* DM4 по гену *phaC3*. Мутация в гене *phaC1* привела к нарушению ассимиляции метанола и снижению скорости роста культуры. Подобного нарушения метаболизма у мутанта по гену *phaC3* не наблюдали.

Для получения новых сведений о роли дополнительных ПГБ-синтаз планируем комплементировать полученные мутанты путем введения плазмид, несущих различные гены ПГБ-синтаз.

Работы выполнены при поддержке гранта РФФИ №13-04-01520-а.

Роль глюкокиназ в метаболизме облигатных метанотрофов

**Солнцева Н.П.^{1,2}, Мустахимов И.И.^{1,2}, Розова О.Н.¹,
Хмеленина В.Н.¹, Троценко Ю.А.¹**

¹Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ

²Пушчинский государственный естественно-научный институт

Аэробные метанотрофные бактерии не используют сахара в качестве ростового субстрата. Гаммапротеобактериальные метанотрофы I типа (включая *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z) ассимилируют углерод через рибулозомонофосфатный (РМФ) путь. Первичный продукт РМФ цикла – фруктозо-6-фосфат, включается в основной метаболизм посредством гликолиза и/или пути Энтнера-Дудорова. В результате первая реакция этих путей – фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата, катализируемая глюкокиназой, не является необходимой. Тем не менее, в аннотированных геномах *M. alcaliphilum* 20Z и других метилотрофов присутствует ген *glu*, кодирующий предполагаемую глюкокиназу. Дальнейший анализ бесклеточных экстрактов показал, что активность глюкокиназы сопоставима с активностью основных/мажорных ферментов.

Ранее было показано, что многие метанотрофы в качестве запасных веществ накапливают гликоген и сахарозу (которая также является одним из осмопротекторов). Сахароза синтезируется с помощью сахарозофосфатсинтазы и сахарозофосфатфосфатазы, и вовлекается в дальнейший метаболизм с участием амилосахаразы, катализирующей перенос гликозильного остатка сахарозы на гликоген или гидролиз сахарозы до фруктозы и глюкозы. Фруктоза далее метаболизируется фруктокиназой (Бут с соавт., 2012). В геномах метанотрофов обнаружены также гены, кодирующие ферменты синтеза и деградации гликогена – гликогенсинтазу, гликогенфосфорилазу и амило-1,6-глюкозидазу, причем последний катализирует образование из гликогена нефосфорилированной глюкозы. Таким образом, появление свободной глюкозы в клетках может быть результатом деградации сахарозы или гликогена под действием различных ферментов. Резонно полагать, что глюкокиназа ответственна за включение образующейся внутриклеточной глюкозы в основной метаболизм. Исходя из этого, целью данной работы явилось изучение свойств рекомбинантной глюкокиназы и выяснение ее роли в метаболизме *M. alcaliphilum* 20Z.

Глюкокиназа *M. alcaliphilum* 20Z – гомодимер с молекулярной массой субъединицы ~35 кДа, имеет оптимумы активности при pH 9,5–10,0 и температуре 60°C. Фермент строго специфичен к АДФ как донору и глюкозе как акцептору фосфатной группы. Продукт реакции АДФ ингибирует его активность (K_i для АДФ = 2,34±0,56 мМ); однако такие метаболиты, как фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат, ФЕП, пируват, АМФ, ФФн, Фн, цитрат, глицерат, лактат, малат, оксалоацетат не оказывают значительного влияния. Работа фермента зависит от ионов Mg^{2+} ($K_m = 0,38$) или Mn^{2+} ($K_m = 0,40$), однако катионы Na^+ , Co^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} или Cu^{2+}

не оказывают существенного влияния. Активность глюкокиназы подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (K_m для глюкозы = $0,21 \pm 0,02$ мМ, для АТФ = $0,3 \pm 0,05$ мМ). Максимальная скорость реакции V_{max} составила 131 Е/мг белка. В присутствии АДФ $V_{max} = 129$ Е/мг белка, K_m для АТФ = $0,56$ мМ.

Для выяснения связи глюкокиназы с метаболизмом сахарозы и гликогена у *M. alcaliphilum* 20Z нами были получены и охарактеризованы мутанты с инсерциями в генах *Δglu*, *Δsps* и *Δams*, кодирующих глюкокиназу, сахарозофосфатсинтазу и амилосахаразу соответственно, а также двойные мутанты *Δglu/Δsps* и *Δglu/Δams*. Полученные мутанты имели меньшую скорость роста по сравнению с диким типом (*wt*). Это свидетельствует о важной роли глюкокиназы в метаболизме метанотрофа.

Методом N^1 -ЯМР у дикого и мутантных штаммов *M. alcaliphilum* 20Z анализировали внутриклеточное содержание сахарозы, гликогена, глюкозы и трегалозы. У мутантов *Δsps* и *Δams* обнаружен высокий уровень гликогена, сравнимый с таковым в клетках дикого типа, однако у мутантов *Δglu*, *Δglu/Δams* и *Δglu/Δsps* содержание гликогена резко падает, что свидетельствует о решающей роли глюкокиназы в реакциях синтеза/деградации данного полисахарида. Сахароза практически отсутствовала не только в клетках, мутантных по сахарозофосфатсинтазе – *Δsps* и *Δglu/Δsps*, но и в клетках мутанта *Δglu*. Однако появление сахарозы у мутанта *Δglu/Δams* на фоне ее отсутствия у *Δglu* свидетельствует о связи глюкокиназы с деградацией сахарозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что накопление запасных углеродных соединений является важным процессом для стабильного роста *M. alcaliphilum* 20Z. Содержание свободной глюкозы существенно возрастает у мутанта по глюкокиназе и коррелирует с повышенным уровнем трегалозы на фоне снижения количества сахарозы и гликогена. Увеличение уровня трегалозы указывает на наличие метаболического стресса у мутанта *Δglu* (Lunn, 2002). Кроме того, глюкоза может влиять на метаболические процессы в клетках, неспецифически гликозилируя белки и нарушая их функционирование.

Гены, гомологичные АТФ-зависимой глюкокиназе найдены в геномах всех облигатных метанотрофов. Более того, у некоторых метанотрофов наряду с АТФ-зависимыми глюкокиназами имеется ген, кодирующий полифосфат-зависимую глюкокиназу. Присутствие глюкокиназ у метанотрофов, не растущих на сахарах или других полиуглеродных субстратах, очевидно, имеет связь с метаболизмом эндогенной сахарозы и гликогена. Гены биосинтеза гликогена и/или сахарозы присутствуют у подавляющего большинства метанотрофов I типа, однако у метанотрофов II типа с сериновым циклом C_1 -ассимиляции гены, ответственные за биосинтез сахарозы, не обнаружены, хотя гены синтеза гликогена имеются у большинства представителей этих бактерий. Исключение составляют метанотрофы II типа *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylosinus* sp. LW3 и *Methyloferula stellata* AR4, в геномах которых не найдены гены синтеза гликогена и сахарозы, что коррелирует с отсутствием у них глюкокиназ. Из опубликованных в Database геномов метанотрофов следует, что лишь *Methylocapsa acidiphila* B2 имеет ген глюкокиназы при отсутствии генов синтеза гликогена и сахарозы.

Филогенетически глюкокиназа *M. alcaliphilum* 20Z относится к группе А семейства гексокиназ и проявляет 60% идентичности транслированных аминокислотных последовательностей с ферментами бактерий рода *Methylomonas*, а также *Methylovulum miyakonense*, *Methylobacter tundripaludum*, *Methyloglobulus morosus*, *Methylosarcina fibrata*, *Methylocaldum szegediense*, *Sulfurovum* sp., *Thiothrix nivea* и *Thiomicrospira kuenenii*, и менее 50% с глюкокиназами из других гаммапротеобактерий. Тот факт, что глюкокиназа

M. alcaliphilum 20Z лежит в кластере, близком к кластеру гексокиназ из сероредуцирующих бактерий свидетельствует о возможности горизонтального переноса гена данного фермента между этими группами протеобактерий.

Глюкокиназа играет важную роль при реутилизации сахарозы и гликогена, обеспечивая вовлечение образующейся глюкозы в ассимиляционные процессы. Широкая распространённость генов, кодирующих глюкокиназы, среди метанотрофов свидетельствует о важной функциональной роли этого фермента. Функциональность, биохимические свойства и регуляторная роль полифосфат- и АТФ-зависимых глюкокиназ и механизм влияния свободной глюкозы на метаболизм метанотрофов требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-14-01045).

Биосинтез полигидроксibuтирата метилобактериями *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2

Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А.

Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

Полигидроксibuтират (**ПГБ**) – полимер микробного происхождения – синтезируется многими прокариотами при несбалансированных условиях роста (лимит по одному из питательных веществ при избытке углерода). Получаемый микробиологическим способом **ПГБ** имеет широкие перспективы применения благодаря биоразлагаемости, биосовместимости и термопластичности.

В биотехнологическом производстве себестоимость продукта на 40% определяется ценой источника углерода. Аэробные метилотрофные бактерии, использующие дешевый возобновляемый субстрат, метанол, в качестве источника углерода и энергии, считаются перспективными продуцентами **ПГБ**. Большинство известных метилотрофных продуцентов синтезируют **ПГБ** с низкой молекулярной массой (**Мм**), что обуславливает хрупкость полимера.

Цель работы – сравнительное изучение параметров биосинтеза **ПГБ** из метанола аэробными метилобактериями *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2 и характеристика основных физико-химических свойств синтезируемых биополимеров.

Культивирование проводили в две стадии. Интенсивный рост штаммов в ферментере происходил на первой стадии культивирования, когда достаточное количество азота обеспечивалось NH_4OH , который использовали для поддержания pH. На второй стадии культивирования, когда pH среды поддерживали раствором NaOH, происходило постепенное потребление остаточных ионов NH_4^+ . При этом создавался лимит по азоту при избытке углерода. Культуры начинали усиленно синтезировать **ПГБ**. Обе культуры к началу стационарной фазы роста накапливали максимальное количество **ПГБ** (20 – 40%).

При увеличении содержания остаточного азота в среде культивирования *M. extorquens* G10 уменьшалась **Мм** полимера (250 → 85 кДа), тогда как *M. halotolerans* C2

синтезировал прочный высокомолекулярный полимер (~3000 кДа) независимо от остаточного содержания источника азота (таблица 1).

Таблица 1

Биосинтез **ПГБ** метиловыми бактериями при различных остаточных концентрациях источника азота

Культура	Время культивирования, ч	Остаточная концентрация NH_4^+ , г/л	Сухая биомасса, г/л	Содержание ПГБ в биомассе, %	Мм ПГБ , Да
<i>M. extorquens</i> G10	76	0	54,8	39,2	252000
	72	0	50,0	39,5	230000
	71	0,1	60,4	29,0	153000
	72	0,17	62,0	2,0	85000
<i>M. halotolerans</i> C2	72	0	42,0	17,4	3400000
	84	0,05	48,2	12,6	2616000
	80	0,22	51,6	5,2	2930000

Примечательно, что **ПГБ**, синтезируемый культурой *M. halotolerans* C2, обладал более высокими значениями **Мм** (> 3 млн. Да), температуры плавления и степени кристалличности, нежели **ПГБ**, синтезируемый *M. extorquens* G10.

В таблице 2 представлены основные физико-химические свойства **ПГБ**, синтезируемых *M. halotolerans* C2 и *M. extorquens* G10.

Таблица 2

Физико-химические свойства **ПГБ** метилотрофных продуцентов, выращенных на метаноле

	<i>M. halotolerans</i> C2	<i>M. extorquens</i> G10
Мм полимера, Да	$3.3 \cdot 10^6$	$15 \cdot 10^4$
Температура плавления, °С:		
Пик I	183.0	176.3
Пик II	-	165.9*
Температура кристаллизации, °С	74.7	80.2
Энтальпия плавления, Дж/г	234.6	78.69
Энтальпия кристаллизации, Дж/г	167.9	36.19
Степень кристалличности, %	71	67

* Следовые количества другой формы биополимера.

Таким образом, несмотря на сходство путей C_1 -метаболизма и синтеза **ПГБ**, исследуемые метиловыми бактериями синтезировали полимеры с разной молекулярной массой и по-разному реагировали на остаточный азот в среде: **Мм** полимера *M. extorquens* G10 уменьшалась, **Мм ПГБ** *M. halotolerans* C2 не зависела от остаточного содержания источника азота.

Предполагается, что обнаруженные свойства полимера штамма C2 позволят после специальной обработки получить цепи с высокой степенью ориентации. Эти волокна можно будет использовать в медицине в качестве биodeградируемых (шовных) нитей, а также – как компонент композитных материалов.

Высокие значения Мм ПГБ могут быть обусловлены большей процессивностью ПГБ-синтазы/полимеразы *M. halotolerans* С2 по сравнению с таковой *M. extorquens* G10.

Установлено, что исследуемые метиловобактерии использовали метанол-сырец аналогично чистому метанолу, что существенно снижало себестоимость получаемого полигидроксибутирата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31352.

Свойства и роль фосфотрансацетилазы в метаболизме *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z

**Бочарова К.А.^{1,2}, Розова О.Н.¹, Бут С.Ю.¹, Хмеленина В.Н.¹,
Троценко Ю.А.¹**

¹ Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

² Пушчинский государственный естественно-научный институт

Метан – существенный компонент глобального цикла углерода и один из наиболее опасных парниковых газов. Являясь доминирующей составной частью природного газа и возобновляемого биогаза, метан считается перспективным источником углерода для продукции полезных соединений с использованием аэробных метанотрофов и их ферментов в качестве биокатализаторов. Важным аспектом успешного применения метаболического потенциала метанотрофов в биотехнологии является характеристика биохимических путей и их генетическая модификация. Галокалотолерантный метанотроф *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, растущий с высокой скоростью на метане в широком диапазоне солености (0,5–10% NaCl) и pH (pH 7,5–10), а также при высоких концентрациях метанола (до 7% по объему), является одним из перспективных продуцентов полезных соединений из метана и модельным организмом при изучении специфического метаболизма метанотрофов. Его геном секвенирован и аннотирован (NC_016112.1). Штамм ассимилирует углерод метана на уровне формальдегида через рибулозомонофосфатный (РМФ) путь с образованием в качестве первичных продуктов фосфосахаров. Фосфосахара далее включаются в основной метаболизм посредством гликолиза и пути Энтнера-Дудорова. Недавно у метанотрофов с РМФ-циклом обнаружены ксилулозо-5-фосфат/фруктозо-6-фосфат фосфокетолаза и ацетаткиназа, коэкспрессия которых предполагает функционирование у *M. alcaliphilum* 20Z третьего, фосфокетолазного, пути распада фосфосахаров (Rozova et al., 2015).

Фосфокетолазный путь распада фосфосахаров является шунтированным аналогом гликолиза, энергетически более эффективным, по сравнению с классическим вариантом. Кроме того, фосфокетолазный путь напрямую ведет к синтезу C₂-соединений (ацетилфосфата и ацетата) из первичных метаболитов C₁-ассимиляции. Дальнейшая судьба продуктов фосфокетолазного пути неясна, но предположительно заключаются в синтезе ацетил-КоА – предшественника осмопротектора эктоина и жирных кислот, необходимых для формирования обширной сети внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ).

Цель данной работы – изучение свойств и роли фосфотрансацетилазы, кодируемой геном *pta* у *M. alcaliphilum* 20Z.

Гомогенный препарат фермента с гексагистидинами на С-конце был получен клонированием гетерологичной экспрессией гена *pta* (MALCv4_2342) в *Escherichia coli* и очисткой с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии. Показано, что у *M. alcaliphilum* 20Z фосфотрансацетилаза (ЕС 2.3.1.8) катализирует обратимую реакцию синтеза ацетил-КоА из ацетилфосфата:



Фермент активен в широком диапазоне рН 6,5-9,0 с максимальной активностью при рН 8,0 и при температуре 50°C. Поскольку *M. alcaliphilum* 20Z - мезофил, свойства фермента изучали при 30°C. Кривые насыщения фермента субстратами в прямой и обратной реакциях подчинялись уравнению Михаэлиса-Ментен. В оптимальных условиях измерения при различных концентрациях одного субстрата и насыщающих другого были определены значения K_m каж и V_{max} для субстратов реакции (Таблица).

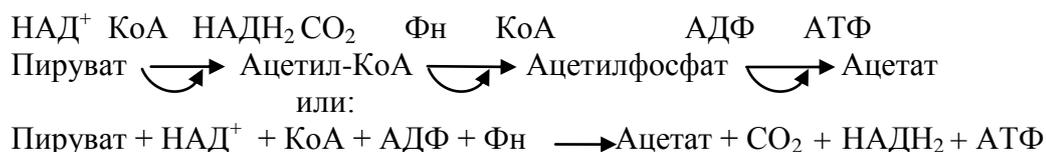
Таблица

Кинетические константы рекомбинантной фосфотрансацетилазы *M. alcaliphilum* 20Z

K_m , mM	V_{max} , Е/мг белка	V_{max} / K_m			
		Ацетилфосфат	Ацетил-КоА	Ацетилфосфат	Ацетил-КоА
1,27±0,102	0,028±0,0008	138,6±7,39	29,2 ± 0,55	109	1042

V_{max} в реакции образования ацетил-КоА в 4,5 раза выше таковой в направлении образования ацетилфосфата. Однако фермент работает с ацетил-КоА в 10 раз более эффективно с ацетил-КоА ($V_{max} / K_m = 1042$) по сравнению с ацетилфосфатом ($V_{max} / K_m = 109$). Какие-либо аллостерические регуляторы фермента не выявлены. Двухвалентные металлы (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+}), а также пируват, фосфоенолпируват, цитрат, серин, лактат, α -кетоглутарат, глицерат, АТФ, АДФ, АМФ, ФФн, Фн, рибозо-1-фосфат, рибулозо-5-фосфат, глюкозо-1-фосфат, фруктозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, не оказывали значительного влияния на активность фермента при насыщающих концентрациях субстратов. Следовательно, функционирование фосфотрансацетилазы *in vivo* зависит исключительно от концентраций в клетках субстратов данного фермента.

Основываясь на кинетических свойствах фосфотрансацетилазы можно предположить, что у *M. alcaliphilum* 20Z фермент *in vivo* предпочтительно функционирует в направлении синтеза ацетилфосфата из ацетил-КоА, при этом основным источником ацетил-КоА для данной реакции является окислительное декарбоксилирование пирувата, образующегося при распаде фосфосахаров в реакциях пирофосфат-зависимого гликолиза и/или пути Энтнера–Дудорова. Последующее дефосфорилирование ацетилфосфата обратимой ацетаткиназой (Rozova et al., 2015) сопровождается синтезом ацетата и АТФ:



Проведенный ранее изотопный анализ метаболитов в клетках данного метанотрофа выявил, что доминирующим путем распада фосфосахаров до пирувата является пирофосфат-зависимый гликолиз, при этом основным экзометаболитом при культивировании штамма в микроаэробных условиях является ацетат (Kalyuzhnaya et al., 2013). Следовательно, фосфотрансацетилаза *M. alcaliphilum* 20Z функционирует сопряженно с пируватдегидрогеназным комплексом и является компонентом метаболического пути, осуществляющего ферментацию формальдегида до ацетата с образованием дополнительной метаболической энергии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№14-14-01045).

Список литературы:

1. Rozova O.N., Khmelenina V.N., Gavletdinova J.Z., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A. Acetate kinase – an enzyme of the postulated phosphoketolase pathway in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. V. 108. № 4. P. 965-974.
2. Kalyuzhnaya M.G., Yang S, Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Gowda G.A., Raftery D., Fu Y., Bringel F., Vuilleumier S., Beck D.A., Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N., Lidstrom M.E. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. *Nat Commun*. 2013. 4:2785.

Эпифитные микроорганизмы-деструкторы ПАУ филлосферы городских древесных растений

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

Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

Накопление полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в природе представляет серьезную опасность, поскольку многие из них являются токсичными и канцерогенными соединениями. Концентрация ПАУ в воздухе современных мегаполисов может достигать 10 нг/м³ и более, особенно в районах промышленных производств. В настоящее время неизвестны достаточно эффективные способы борьбы с атмосферным загрязнением ПАУ. Однако всё больший интерес вызывает способность микроорганизмов, колонизирующих филлосферу, к деградации таких ПАУ, как фенантрен, аценафтен, пирен и др. Показано, что аккумуляция ПАУ листьями растений коррелирует с концентрацией этих соединений в окружающей среде. Полная деградация или частичная трансформация ПАУ микробными сообществами, колонизирующими листву городских растений, препятствует рециркуляции ПАУ в природе. Поскольку поверхность листа является специфической экологической нишей, видовое и генетическое разнообразие филлосферных микробных сообществ отличается от почвенных. Изучение деструкторов ПАУ, колонизирующих филлосферу, интересно с точки зрения поиска новых микроорганизмов-деструкторов, а также новых комбинаций катаболических генов, и возможно, новых биохимических путей. Подобные исследования могут также иметь практическую цель – выдвижение рекомендаций по озеленению промышленных территорий видами декоративных растений, наиболее хорошо колонизируемыми микроорганизмами-деструкторами ПАУ.

Целью данного исследования являлась идентификация микроорганизмов, колонизирующих филлосферу древесных растений урбанистических зон, и изучение влияния загрязнения окружающей среды ПАУ на состав филлосферных микробных сообществ.

Со смывов листовых пластинок трех древесных растений (липы (*Tilia* sp.), клена (*Acer* sp.) и ясеня (*Fraxinus* sp.) методами прямого высева и накопительных культур на минеральной среде Эванса было выделено 180 штаммов-деструкторов фенантрена, нафталина и салицилата. Установлено, что около трети всех изолированных штаммов-деструкторов способны к росту на БТЭК (смесь бензола, толуола, этилбензола и *m*-, *p*-, *o*-ксилолов) в качестве единственного источника углерода и энергии. Среди штаммов-деструкторов фенантрена, полученных методом накопительных культур, был выявлен только один штамм-деструктор салицилата. Возможно, остальные деструкторы фенантрена утилизируют данное соединение через *o*-фталат.

Геномный фингерпринт (REP-PCR) показал, что штаммы, выделенными с поверхности листьев методом накопительных культур на фенантрена, по степени сходства формируют 14 типов, из них шесть типов содержат по одному штамму. Штаммы-деструкторы, полученные из накопительных культур на салицилате, обладают меньшим генотипическим разнообразием и образуют всего пять типов. REP-PCR деструкторов фенантрена, выделенных методом прямого высева, помог разделить штаммы по степени сходства на 11 типов, из которых два типа содержат по одному штамму. Установлено, что микробиота листовых пластинок разных представителей древесных растений уникальна, их филлосферный микробный профиль не совпадает, несмотря на близость произрастания.

Идентификацию штаммов-деструкторов, выделенных методом накопительных культур на соответствующем источнике углерода и энергии (фенантрен или салицилат), проводили с использованием системы MALDI Biotyper. Показано, что при высеве на агаризованную среду в накопительных культурах на салицилате преобладают представители *Gamma*proteobacteria (*Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp) и *Actinobacteria* (*Arthrobacter* spp.). В отличие от эпифитных штаммов-деструкторов салицилата, на агаризованной среде с фенантреном в качестве единственного источника углерода и энергии преобладают преимущественно *Actinobacteria* (*Arthrobacter* spp., *Terrabacter* spp.), *Alphaproteobacteria* (*Methylobacterium* sp.) и, в меньшей степени, *Gamma*proteobacteria (*Pseudomonas* spp.). Штаммы-деструкторы нафталина методом накопительного культивирования не были выделены.

В ходе накопительного культивирования из аликвот культуральной среды были получены препараты тотальной микробной ДНК на начальном и конечном этапах культивирования. Данные препараты ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР со специфичными олигонуклеотидными праймерами к варибельному участку гена 16S РНК. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГЭ) полученных ПЦР-продуктов показал, что в ходе культивирования определенные микроорганизмы проявляют доминирование, причем, на разных этапах культивирования это могут быть разные микроорганизмы.

Анализ частичных нуклеотидных последовательностей генов 16S РНК этих микроорганизмов показал, что в накопительной культуре на салицилате в исследуемых образцах преобладают представители *Gamma*proteobacteria – *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. Накопительные культуры на фенантрена, по сравнению с салицилатом, показывают большее разнообразие эпифитной микрофлоры, способной к катаболизму ПАУ.

В соответствующих образцах присутствуют представители *Alphaproteobacteria* (*Rizobium* sp.), *Betaproteobacteria* (*Variovorax* sp., *Acidovorax* spp.), *Gammaaproteobacteria* (*Pseudomonas* spp.) и *Bacteroidetes* (*Sphingobacterium* spp.).

В образцах тотальной ДНК, выделенной из накопительных культур на нафталине, отсутствовали ярко выраженные мажоры. Кроме того, при высеве данных образцов на чашки Петри с нафталином в качестве единственного источника углерода и энергии, не было выделено ни одного штамма-деструктора нафталина. Не исключено, что количество эпифитных филлосферных Nah^+ штаммов в исследованных образцах невелико по сравнению с Sal^+ и Phn^+ штаммами.

Бактерии рода *Rhodococcus*, утилизирующие парафины в широком температурном диапазоне

Фунтикова Т. В., Пунтус И. Ф., Гафаров А. Б., Филонов А. Е.

Лаборатория биология плазмид ИБФМ РАН

Нефть и нефтепродукты оказывают непрерывно возрастающее влияние на биосферу нашей планеты. В настоящее время нефть по-прежнему является одним из наиболее востребованных источников энергии в мире, и проблема очистки водных и почвенных ресурсов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами продолжает оставаться одной из самых острых. Россия в этом плане не является исключением. Примерно 7% всех функционирующих нефтяных месторождений в России имеет высокую загрязненность территории, 70% - среднюю.

Из образцов нефтезагрязненных почв, отобранных с территорий Ямало-ненецкого Автономного Округа (ЯНАО) и с территории Казахстана было выделено 47 штаммов-нефтедеструкторов, способных утилизировать углеводороды нефти в широком температурном диапазоне (4-37°C). Исследование их деградационной активности и физиологических свойств позволило отобрать семь наиболее эффективных штаммов-деструкторов парафинов, перспективных для разработки биопрепаратов. Было определено их таксономическое положение. Из клеток исследуемых микроорганизмов была выделена тотальная ДНК по методике Ausubel et al., 2003. Проведена ПЦР с праймерами специфичными для генов 16S рДНК. Были получены и секвенированы ампликоны для идентификации штаммов. Очистку ПЦР-продуктов выполняли по протоколу QIAquick PCR purification Kit Protocol (QIAquick Spin handbook, 2008). Секвенирование проводили в лаборатории молекулярной генетики Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ на секвенаторе Applied Biosystems 3130×1 с использованием набора для секвенирования BigDye v.3.1. Было прочитано 1400 пар нуклеотидов. Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей к анализируемым фрагментам генов выполняли с помощью программы BLAST. Согласно результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК все 7 исследуемых штаммов принадлежат к роду *Rhodococcus*. Для 4 штаммов установлена видовая принадлежность - *Rhodococcus erythropolis*. Для трех штаммов установить видовую принадлежность не удалось, так как отсекуенные участки проявили 99% сходства к таковым участкам нескольких видов. Для дальнейшей характеристики микроорганизмов планируется использовать метод МАЛДИ (Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация).

Низкая биодоступность для микробной деструкции многих органических поллютантов, таких как нефть, мазут, креозот, полициклические ароматические углеводороды в значительной степени обусловлены их крайне малой растворимостью в воде, что является одной из причин высокой устойчивости этих поллютантов в окружающей среде. При выращивании на специфических субстратах (n-алканы, керосин, нефть, различные масла) многие микроорганизмы синтезируют биосурфактанты, которые могут экскретироваться в среду, либо накапливаться на поверхности клетки. Продукция биосурфактантов зависит от штамма микроорганизма, ростового субстрата и условий культивирования. Бактерии рода *Rhodococcus* являются одними из наиболее распространенных углеводородокисляющих микроорганизмов, так как легко приспосабливаются к экстремальным условиям среды - повышенной и пониженной температурам, колебаниям солености, пониженной влажности и т.д. Для исследуемых штаммов был проведен скрининг на способность к продукции биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ) при росте на среде, содержащей дизельное топливо. Микроорганизмы выращивали при периодическом культивировании в среде Эванса, содержащей дизельное топливо, в течение 7 суток. Эмульгирующую активность оценивали визуально по методике Francey et al. и измеряя поверхностное натяжение. По визуальной оценке все семь исследуемых штаммов продуцировали биоэмульгаторы.

Таблица 1

Показатели поверхностного натяжения культуральной среды после культивирования микроорганизмов в течение 7 дней на среде Эванса с дизельным топливом

Штаммы	Поверхностное натяжение мН/м		
Ф2/1-Н4	41	40	40
Ф2/2-Н4	31	40	36
Т3-ДТ	54	53	53
Б/1-Н	55	55	55
Т3-ДТ4	50	49	50
К2-Н	60	59	58
К1-Н4	56	54	55

Исследуемые микроорганизмы снижали поверхностное натяжение культуральной среды до 31 мН/м, что свидетельствует о выраженной эмульгирующей активности этих штаммов. Для выявления локализации биоПАВ клетки отделяли от культуральной среды и определяли оптическую плотность безклеточной культуральной среды при добавлении гексадекана. Для штаммов Ф2/2-Н4 и Ф2/1-Н4 было показано, что биоПАВ не связаны с клеточной стенкой микроорганизмов и продуцируются в культуральную жидкость при росте на гидрофобных субстратах (нефть и дизельное топливо). Для остальных штаммов показано, что продуцируемые биоПАВ были связаны с клеточной стенкой.

Изучение генетического контроля деградации твердых парафинов является важной задачей для создания более эффективных технологий биоремедиации нефтезагрязненных территорий. К настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал, показывающий, что процесс биodeградации поллютантов бактериями часто контролируется плазмидными генами. Кроме того, наличие конъюгативных плазмид биodeградации в клетках микроорганизмов-нефтедеструкторов может обеспечить перенос

катаболических генов в клетки аборигенных микроорганизмов, расширяя их деградационный потенциал и повышая эффективность очистки. Для выявления наличия плазмид в штаммах микроорганизмов использовали метод пульс-электрофореза, который показал, что все 7 исследуемых эффективных штаммов-нефтедеструкторов содержат плазмиды размером от 20 до 1000 т.п.н., а в двух штаммах содержится по две плазмиды размерами 150 и 300 т.п.н.

С использованием специфичных праймеров у всех семи штаммов обнаружены гены, кодирующие ферментную систему *alk*, первым ферментом которой является мембранная алкангидроксилаза.

Таким образом, семь исследуемых штаммов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus*, деградирующих углеводороды нефти в широком температурном диапазоне (4-37°C), продуцирующих биоПАВ, перспективны и могут быть использованы для создания ассоциаций микроорганизмов в системах очистки окружающей среды.

Мониторинг загрязненных нефтью почв Приаральского региона

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

Лаборатория биология плазмид ИБФМ РАН

Ухудшение экологической обстановки во многих странах мира связано с загрязнением окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Ежегодно Казахстан добывает более 50 млн. тонн сырой нефти и более 10,5 млн. газоконденсата, занимая 12-е место в мире по разведанным запасам нефти и газового конденсата. Нефтегазоносные районы занимают площадь около 1,7 млн. км². К 2015 году Казахстан довел добычу нефти до 150 млн. т в год и вошел в десятку крупнейших нефтедобывающих стран мира. По данным МООС РК общая площадь нефтяного загрязнения в Западном Казахстане составляет 194 тыс. га, а объем разлитой нефти - более 5 млн. т. (<http://2010.east-link.eu/files/Main/documents/corpi/Report%20in%20russian.pdf>).

Таким образом, проблема загрязнения приобрела такие масштабы, при которых практически невозможны экскавация и очистка загрязненной почвы *ex situ*. Альтернативным походом являются методы биоремедиации *in situ*. Методы биологической очистки применимы в условиях умеренного и жаркого климата, однако, при этом должны учитываться специфические особенности процессов биоремедиации. Отличительной особенностью нефтяных загрязнений в Приаральском регионе Казахстана является то, что данные территории находятся, главным образом, в климатической зоне с преобладанием высоких температур в летний период, а почва представляет собой солончаки с содержанием соли 3-4%, очень низкими показателями влажности и содержания органических веществ.

Объектом исследования стали почвы Южно-Тургайского прогиба, загрязненные нефтью. Образцы отбирали с территорий месторождения «Кумколь» (АО «Тургай Петролеум»), «Кумколь» (АО «Петро Казахстан»), «Таур» (ТОО «КазПетролГрупп») и «Ащисай» (АО КОР). Содержание нефти в загрязненной почве определяли гравиметрическим методом. Показано, что уровень загрязнения углеводородами нефти образцов почвы, отобранных с территории нефтяных месторождений «Кумколь» (АО «Тургай Петролеум») и «Ащисай» (АО КОР) высокий (66, 87 и 102,69 г/кг). Таким образом, исследуемые образцы почвы по уровню загрязнения остаточной нефтью

соответствуют 5 уровню экологического загрязнения, когда требуется проведение биоремедиационных мероприятий для восстановления почвенных экосистем.

Таблица 1

Уровень загрязнения почв нефтяных месторождений Южно-Тургайского прогиба

№	Месторождение	Содержание нефти в загрязненной почве, г/кг
1	Месторождение «Кумколь» (АО «Тургай Петролеум»)	66, 87
2	Месторождение «Таур» (ТОО КазПетролГрупп)	26, 30
1	Месторождение «Кумколь» (АО «Петро Казахстан»)	12,12
2	Месторождение «Ащисай» (АО КОР)	102,69

Углеводородный состав нефти в почвенных образцах определяли с помощью газовой хромато-масс спектрометрии. Результаты хроматографического анализа показали, что в нефтях преобладают неразветвленные алканы (до 73%), разветвленные алканы до 12%, нафтены до 7% и до 5,90% аренов. Также в нефтях содержатся кислород-, сера-, галогенсодержащие производные углеводородов. Нефть месторождения Кумколь (АО «Петро Казахстан») несколько отличается от других исследуемых нефтей. Она содержит 60,09% алканов (из них 12,38% разветвленные, 47,71% неразветвленные), незначительное количество нафтенов и аренов (1%), но высокий процент кислород-, сера, галогенсодержащих производных углеводородов (38,40%).

Таблица 2

Углеводородный состав нефтей в почвах месторождений Южно-Тургайского прогиба

Месторождение	Алканы		Нафтены	Арены	Другие соединения
	Неразветвленные	Разветвленные			
«Кумколь» (АО «Тургай Петролеум»)	70,06	10,04	6,10	5,90	7,90
«Таур» (ТОО КазПетролГрупп)	73,14	12,25	6,70	0,59	7,32
«Кумколь» (АО «Петро Казахстан»)	47,71	12,38	0,82	0,70	38,40
«Ащисай» (АО КОР)	65,28	12,36	6,73	3,72	11,91

Далее был проведен микробиологический анализ изучаемых почв. Исследовали общую численность микроорганизмов, численность микроорганизмов – деструкторов дизельного топлива и нефти. Результаты представлены в Таблице 3. Наименьшая численность микроорганизмов, включая нефтедеструкторы, отмечена в образцах из месторождения «Ащисай», что, видимо, обусловлено наивысшим уровнем загрязнения нефтепродуктами. В ходе работы из почвенных образцов выделено двадцать культур микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти, которые способны утилизировать алканы, моноароматические углеводороды – этилбензол, толуол, фенол.

Таблица 3

Результаты микробиологического анализа почвенных образцов, отобранных на различных месторождениях Республики Казахстан

Пробы почвы	Общая численность микроорганизмов кл/г почвы	Численность микроорганизмов – деструкторов дизельного топлива, кл/г почвы	Численность микроорганизмов – деструкторов нефти, кл/г почвы
«Кумколь» (АО «Петро Казахстан»)	$4,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$
«Кумколь» (АО «Тургай Петролеум»)	$2,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$
«Таур» (ТОО КазПетролГрупп)	$1,7 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$
«Ащисай» (АО КОР)	$4,2 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$

Полученные результаты будут использованы при разработке концепции мониторинга нефтезагрязненных почв с использованием физико-химических и микробиологических методов анализа и стратегии очистки конкретных загрязненных территорий с использованием агротехнических и биоремедиационных мероприятий.

Гемолизин II, контролируемый HlyII, атакует эукариотические клетки и ткани

Ковалевская Ж.И., Бударина Ж.И., Назель А.С., Холодков О.А., Солонин А.С.

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Bacillus cereus синтезирует ряд белков, обладающих сильным токсическим действием, и является условно-патогенным для животных и человека. Эти бактерии могут проникать в кровяное русло и распространяться по всему организму, попадая в ткани мозга, легких, в сердечные клапаны, в печень и другие ткани организма. Инфицирование часто наблюдается у пациентов в больницах в условиях продолжительного стационарного лечения. К основным цитолитическим белкам, кодируемым *Bacillus cereus*, относится гемолизин II (HlyII), проявляющий пороформирующую активность на мембранах различных типов клеток.

Гемолизин II и бактерии, его синтезирующие, оказывают токсическое действие на макроорганизмы из разных таксономических групп, которые наиболее часто используются в экспериментах (дафнии, рыбы, водоросли). В данной работе продемонстрировано поражающее действие гемолизина II на ткани и клетки млекопитающих. В экспериментах использованы как природный штамм *B. cereus* B-771, так и рекомбинантные штаммы на основе *B. subtilis* BD170: BD170-EN2, содержащий ген гемолизин II, и BD170-EN2R с генами гемолизина II и его регулятора. Показано, что при внутривенном введении исследуемые штаммы оказывают летальное действие на белых мышей. При введении *B. cereus* ЛД50, зафиксированная через сутки, составляет 10^5 клеток, BD170-EN2 – 10^7 клеток. Тогда как при введении мышам контрольного штамма *B.*

subtilis BD170, не продуцирующего гемолизин II, и BD170-EH2R с геном репрессором *hlyII*, смертности не зафиксировано. При вскрытии погибших мышей обнаружены патологические изменения кровеносных сосудов в области сердца, легких и глаз.

Продемонстрирована способность HlyII поражать гладкомышечные клетки стенки тонкого кишечника мыши, преодолевая их гликокаликсный слой. Пермеабилizованные гемолизином клетки окрашивали пропидиум иодидом. Разработан метод повышения проницаемости мембран (пермеабилizации мембран) гладкомышечных клеток стенок тонкого кишечника с использованием HlyII. Этот метод может использоваться при изучении функционального состояния гладкомышечных клеток в развитии патологии тканей, а также для оценки действия лекарственных препаратов, используемых в лечении соответствующих заболеваний.

Изучение микробных генетических элементов, функционирование которых связано с попаданием бактерий в макроорганизм, является чрезвычайно важным для понимания основ инфекционного процесса и необходимым для эффективной борьбы с заболеваниями, вызываемыми бактериями. В рамках данной работы продемонстрировано, что гемолизин II является существенным вирулентным фактором, способным поражать клетки и ткани млекопитающих.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 14-04-01782 А и №15-34-20940 мол_а_вед.

Глобальный регулятор Fur и окислительный стресс

Салямов В.И., Солонин А.С.

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Ferric Uptake Regulator (FUR) является одним из важнейших плеiotропных регуляторов грам-положительных бактерий, в частности *V. segetis*. Активной формой белка является симметричный димер, содержащий 2-3 атома двухвалентных металлов на каждый мономер, связанных активными сайтами.

Fur *V. segetis*, в частности, регулирует синтез гемолизина II, ответственного за апоптоз макрофагов. Помимо регуляции метаболизма железа Fur может принимать участие в ответе на окислительный стресс. В связи с тем, что атака может проходить в крови, важно определить значение окислительного стресса в регуляции *hlyII* белком Fur. Структурный сайт состоит из четырех остатков цистеина и включает атом цинка. При окислении цистеинов и образовании дисульфидных мостиков удержание цинка внутри сайта становится невозможным, что в теории делает невозможным образование димера и, соответственно, связывание белка с ДНК. Таким образом, регуляция Fur может зависеть рН и наличия активных форм кислорода во внутриклеточной среде.

Показано, что:

- 1) при низких концентрациях Fur работает как димер, при высоких, вероятно, как тетрамер;
- 2) перекись и ЭДТА снижают сродство Fur к ДНК;
- 3) при этом тетрамер образуется при тех же концентрациях; в случае окисленного либо лишенного металлов белка основной ДНК-связывающей формой является тетрамер;
- 4) добавление цинка и меркаптоэтанола повышает сродство Fur к ДНК, тетрамер образуется в тех же концентрациях;

5) мутанты по цистеинам дают ту же картину что и дикий Fur, обработанный ЭДТА или перекисью;

6) связывание ДНК при высокой концентрации Fur можно объяснить формированием тетрамеров непосредственно на субстрате и взаимодействием НТН-мотивов.

Таким образом, эффективность глобального регулятора Fur при наличии S-S связей зависит от присутствия активных форм кислорода в крови.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 14-04-01782 А и №15-34-20940 мол_а_вед.

Белок р7 бактериофага Хр10

*Шадрин А., Mekler V., Sheppard C.M., Wigneshweraraj S.R.,
Северинов К.В., Солонин А.С.*

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Бактериофаги способны использовать транскрипционный аппарат клеток-хозяев для своих нужд. В частности, многие бактериофаги способны использовать бактериальную РНК-полимеразу для реализации своей генетической информации. Бактериофаги, использующие такую стратегию развития, манипулируют бактериальной РНК-полимеразой с помощью специальных транскрипционных факторов, закодированных в геноме бактериофага. Например, бактериофаг Хр10, на ранних стадиях заражения своего хозяина – бактерий вида *Xanthomonas oryzae* ингибирует транскрипционную активность РНК-полимеразы на большинстве промоторов, за исключением одного из промоторов бактериофага, отвечающего за синтез «средних» генов с помощью белка р7. С другой стороны, белок р7 подавляет терминацию и «паузинг» элонгационных комплексов РНК-полимеразы клетки хозяина [1-5].

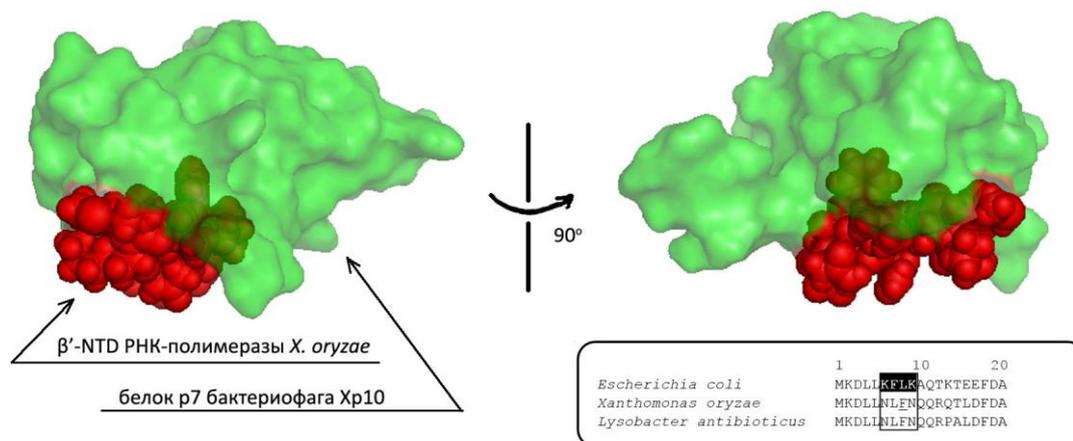


Рис. 1. Структура комплекса белка р7 (прозрачная поверхность) и β' -NTD РНК-полимеразы *X. oryzae* (сферы). PDB 2MC6. На вставке показаны последовательности β' -NTD РНК-полимераз нескольких видов бактерий

Недавно была решена структура белка р7 и комплекса белка р7 совместно с N-концевым доменом β'-субъединицы (β'-NTD) РНК-полимеразы *X. oryzae*. Также был выявлен механизм ингибирования инициации транскрипции РНК-полимеразы клетки хозяина белком р7 [6]. Структурный анализ комплекса белка р7 и β'-NTD позволил объяснить причину отсутствия ингибирования РНК-полимераз бактерий других видов. Ключевую роль во взаимодействии для взаимодействия с р7 играет аминокислотный остаток фенилаланина расположенный, в случае *X. oryzae* в восьмом положении β'-NTD. Гидрофобный радикал фенилаланина проникает вглубь гидрофобного ядра белка р7, что прочно фиксирует белок р7 на молекуле РНК-полимеразы. В случае РНК-полимеразы *E. coli* аминокислотный остаток фенилаланина располагается в девятой позиции β'-NTD, что, учитывая α-спиральную организацию β'-NTD, приводит к его повороту на приблизительно на 109°, относительно позиции в β'-NTD *X. oryzae*. Такое стерическое несоответствие препятствует взаимодействию между молекулами белка р7 и РНК-полимеразы не имеющей остатка фенилаланина в восьмой позиции β'-NTD.

Целью данной работы является детальное исследование механизма действия белка р7 на инициацию транскрипции и выявление роли отдельных элементов промотора Р3 бактериофага Хр10, позволяющих РНК-полимеразе *X. oryzae* избегать ингибирования белком р7.

Для того чтобы определить роль каждого элемента промотора в диссоциации σ^{70} , при ингибировании инициации транскрипции белком р7, мы воспользовались методом тушения флюоресценции, разработанным В. Меклером [9]. Для тестирования были изготовлены зонды – линейные молекулы ДНК представляющие собой различные сочетания элементов промоторов (Рисунок 2А). Результаты предварительных экспериментов показали, что зонды, содержащие -10 и Z-элементы, или передний дуплекс и -10 элемент T5N25CONS промотора не приводили к диссоциации σ^{70} . Однако, зонды содержащие -35 элемент вызывали диссоциацию σ^{70} , как и ДНК полноценного промотора. В конкурентном варианте анализа зонд, содержащий UP-элемент промотора Р3 бактериофага Хр10, показывал наивысшую аффинность к РНК-полимеразе *X. oryzae*. Исходя из этих наблюдений можно предположить, что высокое сродство РНК-полимеразы к UP-элементу промотора Р3 позволяет ей избегать ингибирования белком р7.

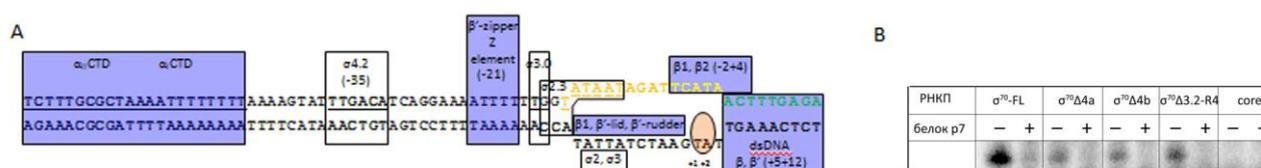


Рис. 2. (А) Схема, показывающая взаимодействие ДНК промотора с молекулой РНК-полимеразы. (В) Результаты ингибирования abortивной инициации транскрипции *in vitro*

Из ранее полученных данных известно, что белок р7 препятствует формированию структуры, состоящей из «flap-tip» домена β-субъединицы РНК-полимеразы (β-flap-tip) и «района 4» σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы (R4) [1, 6]. Именно эта структура отвечает за взаимодействие с -35 элементом промотора [7]. Одной из двух гипотез, объясняющих ингибирующее действие белка р7 при инициации транскрипции, является образование

стерического препятствия для участка ДНК соответствующего -35 элементу промотора, что в итоге приводит к диссоциации σ^{70} .

Для проверки этой гипотезы мы подготовили два мутантных варианта σ^{70} : (i) с делетированным R4 ($\sigma^{70}_{\Delta R4}$) и (ii) с делетированным R4 и линкером «3.2» одновременно ($\sigma^{70}_{\Delta 3.2\Delta R4}$). Результаты реакций abortивной инициации транскрипции *in vitro* показали, что ингибирование транскрипции наблюдается как в случае с холоферментом РНК-полимеразы дикого типа, так и с мутантными холоферментами (Рисунок 2В). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу альтернативной гипотезы, объясняющей ингибирующее действие белка р7 путем ограничения подвижности мобильных доменов РНК-полимеразы, которая необходима для открывания и закрывания «клешни» РНК-полимеразы, происходящего при инициации транскрипции, паузинге и терминации [8].

Выводы:

1. Определена роль отдельных элементов промотора, в процессе ингибирования РНК-полимеразы *X. oryzae* белком р7.

2. Определена основная гипотеза, объясняющая механизм действия белка р7.

Работа выполнена при поддержке фонда Династия.

Список литературы:

1. Nechaev *et al.* 2002. J. Mol. Biol., 320, 11–22.
2. Yuzenkova *et al.* 2003. J Mol Biol. 330(4):735-48
3. Semenova *et al.* 2005. Mol. Microbiol., 55, 764- 777.
4. Yuzenkova *et al.* 2008. J. Mol. Biol., 375, 29–35.
5. Eyunina *et al.* 2015. Proc Natl Acad Sci U S A. 112(7):2017-22.
6. Liu&Shadrin *et al.* 2014. Nucleic Acids Res. 42:4294-305.
7. Kuznedelov *et al.* 2002. Science. 295(5556):855-7.
8. Weixlbaumer *et al.* 2013. Cell. 152(3):431-41.
9. Mekler *et al.*, 2011. J Mol Biol. 413(5):1016-27.

**Термостабильная пептидогликангидролаза бактериофага T5:
бактериолитическое действие *in vitro***

Шаврина М.С.¹, Зимин А.А.², Микулинская Г.В.¹

¹ Группа молекулярной биотехнологии ФИБХ РАН

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Ферменты, опосредующие лизис бактерий, например, гидролизующие пептидогликан клеточных стенок, вызывают большой интерес как потенциальная альтернатива антибиотикам. К преимуществам пептидогликангидролаз можно отнести специфичность воздействия этих ферментов на клеточную стенку, высокую активность, низкую иммуногенность, а также способность лизировать антибиотикорезистентные штаммы.

Эндолизин бактериофага T5 (EndoT5) - пептидогликангидролаза, относящаяся к классу пептидаз, а именно – цинк-содержащая L-аланоил-D-глутаматпептидаза семейства M15, чья структура была недавно охарактеризована [1]. Фермент обладает высокой активностью в буферах с низкой ионной силой в диапазоне рН от 7 до 9 и специфичен к пептидогликану грамотрицательных микроорганизмов, относящемуся к типу A1 γ [2,3].

В настоящей работе были изучены свойства фермента, а также его бактериолитическое действие на живые клетки *Escherichia coli*, индуцированное различными катионными агентами, пермеабиллизующими наружную мембрану.

В частности, нами впервые была исследована устойчивость EndoT5 к нагреванию, для чего фермент подвергали воздействию температур в диапазоне 30-90°C в течение 5, 10 и 30 минут. Результаты представлены на рисунке 1. Было показано, что фермент обладает температурной стабильностью и восстанавливает не менее 65% от исходной активности даже после прогревания при 90°C в течение получаса. Термостабильность является важным преимуществом EndoT5, поскольку конформационная стабильность является абсолютно необходимой при фармацевтическом использовании нативных белков.

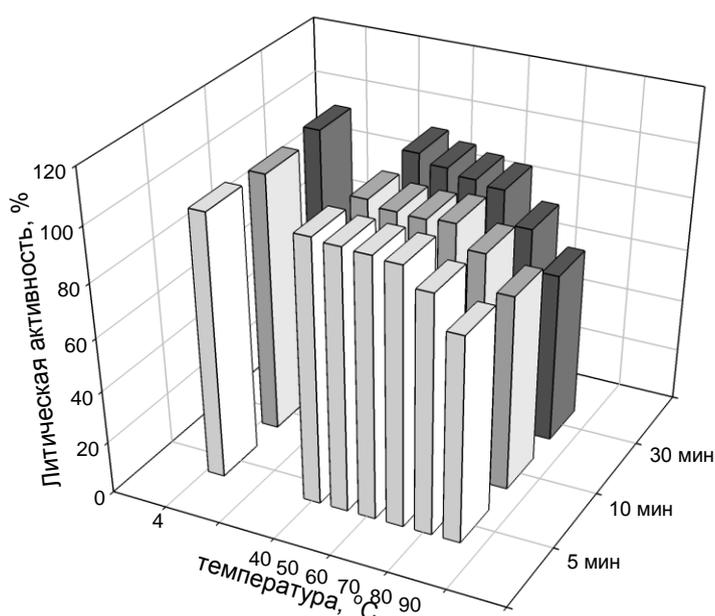


Рис. 1. Температурная устойчивость EndoT5

Мы исследовали бактериолитическое действие EndoT5 на живые клетки грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* в сочетании с агентами, увеличивающими проницаемость наружной мембраны, то есть пермеабиллизующими её. В качестве пермеабиллизующих мембрану компонентов были выбраны пептидные антибиотики с разным механизмом действия – полимиксин В и грамицидин D, - катионный пептид поли-L-лизин (1-5 кДа) и катионный детергент хлоргексидин. Концентрации пермеабиллизующих агентов были подобраны так, чтобы не оказывать значительного влияния на жизнеспособность клеток бактерий в контроле. Для количественной оценки эффекта мы использовали метод подсчета колониеобразующих единиц (к.о.е.) относительно контроля, для чего клетки после инкубации в буфере с агентами и без них в разведениях рассеивали на чашки с богатой средой LB. Результаты расчетов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Антибактериальная активность EndoT5 в сочетании с пермеабиллизующими агентами. Антибактериальную активность вычисляли в логарифмических единицах ($\log_{10}(N_0/N_i)$), где N_0 - исходное число к.о.е., N_i – конечное число к.о.е.)

Пермеабиллизующий агент	Концентрация агента, мкг/мл	$\log_{10}(N_0/N_i)$		
		+агент	+EndoT5 +агент	+EndoT5
Полимиксин В	0.4	0.68±0.05	5.56±1.32	0.59±0.33
Хлоргексидин	0.5	1.16±0.39	6.64±0.61	
Грамицидин D	80	0.65±0.45	5.54±1.25	
Полилизин 1-5 кДа	80	0.70±0.04	4.49±0.24	
Клетки в буфере	-	0.20±0.14		

Было показано, что выбранные агенты в сочетании с EndoT5 оказывали выраженное бактерицидное действие на клетки. Из контрольных экспериментов видно, что действие как EndoT5 одного, так и агентов в выбранных концентрациях вызывает снижение числа к.о.е. Однако использование EndoT5 в сочетании с полимиксином В в концентрации 0.4 мкг/мл позволяло уменьшить количество выживших клеток на 5 порядков, а в сочетании с полилизином в концентрации 80 мкг/мл - на 4 порядка. Сочетание EndoT5 с обычным антисептиком хлоргексидином наиболее эффективно и уменьшает число выживших к.о.е на 6 порядков. Таким образом, мы можем говорить не о суммарном, а о значительном синергическом эффекте двух компонентов – эндолизина и пермеабиллизующего мембрану вещества, что в сочетании с температурной устойчивостью делает EndoT5 перспективным для разработки антибактериальных средств.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 13-04-00991-а.

Список литературы:

1. Prokhorov et al., RSC Adv., 2015, 5, 41041-41049.
2. Mikoulińska et al., FEBS J. 2009, 276(24), 7329-7342.
3. Mikoulińska et al. L-alanoyl-D-glutamate peptidase (bacteriophage T5). Chapter 316, pp. 1411-1414. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edition, Elsevier Ltd., edited by Neil Rawlings and Guy Salvesen, ISBN: 978-0-12-382219-2 (2013).

Подходы к применению нетрансдуцирующих бактериофагов для профилактики и терапии кишечного эшерихиоза свиней

Скоблицов Н.Э.¹, Зимин А.А.²

¹ Лаборатория микробиологии ГНУ СКНИИЖ, г. Краснодар

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Введение. Начиная с первой работы по изучению эффективности применения бактериофагов в лечении эшерихиозной диареи свиней (1), опубликовано значительное количество исследований, посвящённых исследованиям фаготерапии инфекций, вызванных

представителями семейства Enterobacteriaceae и вида *Escherichia coli* в частности (2). Несмотря на высокую эффективность бактериофагов в отношении данной группы возбудителей (3), на пути широкого распространения бактериофагов возникает ряд проблем, среди которых одной из самых серьёзных является их способность к трансдукции и изменению генетических свойств в сторону расширения арсенала факторов патогенности (2). В медицине важность определения трансдуцирующего потенциала фагов (4) признана одним из критериев отбора эффективных и безопасных бактериофагов (5), в то время как важность этого признака в аналогичных работах исследователей в области ветеринарии до последнего времени обходили вниманием. Тем более, отсутствуют данные по изучению эффективности нетрансдуцирующих бактериофагов на моделях инфекций сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы исследований. Получение препаративных количеств нетрансдуцирующих фагов, отобранных из обширной рабочей коллекции в ходе предыдущих работ, реализовывали с помощью методов биотехнологии. Всего было отобрано пять фагов. Для подбора оптимальной схемы применения *in vivo* был взят один фаг (условный лабораторный № 3), выделенный из одного из природных водоёмов Приморского края, идентифицированный как фаг T4-типа семейства Myoviridae, отрицательный по наличию гена *hcs* (гена, кодирующего иммуноглобулиноподобный белок капсида). После инкубации на культуре *E. coli* B, фаг был сконцентрирован методом центрифугирования, в результате чего была получена опытная партия экспериментального фагового препарата в виде взвеси фаговых частиц. Концентрация фага в полученных таким образом экспериментальных препаратах колебалась в пределах от $1,0 \times 10^9$ до $1,4 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

Результаты. Опыт *in vivo* был проведён на поросятах породы СМ-1.

Таблица 1

Схема опыта по выяснению оптимальной схемы применения экспериментальных коли-фаговых препаратов для профилактики пост-отъёмного синдрома поросят (n=30)

№ **	Дозировка ***	Возраст ****	Дни приёма препарата		
1	$1,0 \times 10^{10}$	28 дней	28	31	34
2	$1,0 \times 10^9$	28 дней	28	31	34
3	$1,0 \times 10^{10}$	19 дней	19	22	25
4	$1,0 \times 10^9$	19 дней	19	22	25
5	$1,0 \times 10^{10}$	10 дней	10	13	16
6	$1,0 \times 10^9$	10 дней	10	13	16
7	0	—	—	—	—

* – Количество суток со дня отъёма (32-й день), в течение которых в группах наблюдалась диарея;

** - № группы;

*** - Дозировка препарата (БОЕ/гол);

**** - Возраст первого приёма препарата;

***** - Дни приёма препарата.

Были сформированы 7 групп животных (по 30 голов в каждой группе), отличающиеся по возрасту первого приёма экспериментального фагового препарата: группы №№ 1-2 – на 28-й день, группы №№ 3-4 – на 19-й день, группы №№ 5-6 – на 10-й день. В состав группы № 7 (контрольной) входили гнёзда с поросятами всех возрастов. Животным групп №№ 1-6 вводился экспериментальный фаговый препарат из расчёта $1,0 \times 10^{10}$ БОЕ (группы №1, №3, №5) на голову и $1,0 \times 10^9$ БОЕ (группы №2, №4, №6) на голову с периодичностью 1 раз в трое суток в течение 7 дней (всего по 3 введения на голову) (таблица 1).

Также выяснилось, что продолжительность периода диареи у животных почти у всех опытных групп сократилась по сравнению с контрольной группой (6 сут.). Наименьшей (3 – 4 сут.) она оказалась у животных, получавших фаг в возрасте 28-34 дней. При этом стоит подчеркнуть, что полностью избежать явления диареи не удалось ни в одной из опытных групп. Что касается динамики коли-титра, то у всех групп, получавших фаг, отмечалось снижение содержания Е. после отъёма (к 34-ому дню) с последующим ростом к 37-му дню, а у животных контрольной группы в периоде отъёма не отмечалось снижения содержания Е. на 34-й день.

Интересно, что динамика коли-титра животных опытных групп отличалась своеобразием в зависимости от возраста первого применения фага. Так, у животных, получавших фаг в возрасте 10-16 и 19-25 дней, содержание Е. к 31-му дню более, чем на 0,5 порядка превышало этот показатель у других групп (включая контрольную). Эти же группы отличались значительным разбросом показателя коли-титра в течение периода наблюдения: значительным (до $5,39 \lg$ КОЕ/г) снижением в возрасте 34-х дней и значительным (до $7,69 \lg$ КОЕ/г) повышением к 37-ому дню. Животные групп, получавших фаг в возрасте 28-34 дней, характеризовались наименьшими (в пределах $0,10 - 0,54 \lg$ КОЕ/г) колебаниями содержания Е. за весь период наблюдения. У животных этих же групп отмечались наименьшие показатели коли-титра к 37-му дню: более, чем на $0,69 \lg$ КОЕ/г по сравнению с животными 3-й – 6-й опытных групп и на $0,84 - 0,98 \lg$ КОЕ/г по сравнению животными контрольной группы. При этом различия показателей коли-титра на 37-й день у животных 1-й и 2-й групп были недостоверны.

Таким образом, оптимальной схемой применения фаговых препаратов являлось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста. Применение фага в большей концентрации ($1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову) оказывает менее выраженный эффект как на продолжительность протекания пост-отъёмной диареи, так и на показатели динамики коли-титра. Применение фага в более ранние сроки также характеризуется меньшей эффективностью как по клинической картине, так и по лабораторно контролируемым параметрам.

Выводы.

1. Оптимальной схемой применения нетрансдуцирующих фагов являлось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста.

2. Применение разрабатываемых нетрансдуцирующих фагов в большей концентрации ($1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову) или в более ранние сроки оказывает менее выраженный эффект как на продолжительность протекания пост-отъёмной диареи, так и на показатели динамики коли-титра.

3. В кишечнике поросят в пост-отъёмном периоде наблюдается нарастание титра Е. coliv течение 5 дней после отъёма с $6,27 \lg$ КОЕ/г до $7,27 \lg$ КОЕ/г; при этом на 8-й день отъёма может наблюдаться аутокоррекция коли-титра до $6,85 \lg$ КОЕ/г.

4. В кишечнике поросят в пост-отъемном периоде наблюдается снижение содержания колифагов в течение 8 дней после отъема с 5,53-6,08 lg БОЕ/г до 3,74-3,78 lg БОЕ/г.

Список литературы:

1. Zhang X., McDaniel A. D., Wolf L. E. et al. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 2000;181:664–670.
2. Johnson J R. Shigella and Escherichia coli at the crossroads: machiavellian masquerades or taxonomic treachery. *J Med Microbiol.* 2000; 49 :583–585.
3. Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C. et al. Bacteriophage Treatment of a Severe Escherichia coli Respiratory Infection in Broiler Chickens. *Avian Diseases*, 2003, Vol. 47, No. 4 , pp. 1399-1405;
4. Saunders J. R., Allison H., James C. E. et al. Phage-mediated transfer of virulence genes // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2001. 76:662–666.
5. Masatoshi Yoichi, Masatomo Morita, Katsunori Mizoguchi et al. The criterion for selecting effective phage for Escherichia coli O157:H7 control. *Biochem. Engineering J.* 2004. Vol. №19, pp. 221-227.

Изучение динамики титра колифагов при формировании и развитии кишечного микробиоценоза поросят на фоне приема экспериментального фагового препарата

Скобликов Н.Э.¹, Забашта Н.Н.¹, Москаленко Е.А.¹, Зимин А.А.²

¹ Лаборатория микробиологии ГНУ СКНИИЖ, г. Краснодар

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Введение. Из трёх основных компонентов нормофлоры (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E.coli*) моногастричных животных (в т.ч. свиней), кишечные палочки, обладая наибольшей неприхотливостью и устойчивостью во внешней среде, играют исключительную роль в формировании микробиоценоза кишечника. Кроме того, популяции *E.coli* характеризуются физиологической гетерогенностью, что выражается в амбивалентной роли представителей группы. С одной стороны, непатогенные кишечные палочки с полноценными ферментативными свойствами являются необходимым компонентом микрофлоры, что позволяет использовать штаммы таких бактерий в качестве пробиотика, в т.ч. – и для свиней (1). С другой стороны, эшерихии, несущие генетические детерминанты патогенности, выступают в качестве этиологического фактора развития инфекционных процессов (эшерихиозов). Причиной такой гетерогенности популяций *E.coli* является чрезвычайно высокая генетическая лабильность данных бактерий, а её основой – персистенция в бактериальных популяциях различных генов (патогенности, колициногенности, фертильности, антибиотикорезистентности и др.), и осуществляемое посредством их горизонтального переноса распространение внутри и между популяциями *E.coli* (2). В качестве материального субстрата такого переноса выступают как плазмиды, так и другие мобильные генетические структуры, несущие гены факторов патогенности. В то же время известно, что не только умеренные, но и вирулентные бактериофаги могут играть существенную роль в развитии патогенности, осуществляя трансдукцию генов факторов патогенности, в т.ч. – и генов антибиотикорезистентности (3 - 5).

Постановка задачи. На фоне относительно хорошей изученности динамики бактериальных сегментов микрофлоры, фаговые сегменты изучены недостаточно. Работы в этой области немногочисленны (6), работы по фаговой динамике у свиней отсутствуют.

Работы, посвящённые описанию фаговых профилей микробиоценозов животных (7), крайне немногочисленны и пока ещё не дают возможность составить полноценную картину систем «бактерия-фаг» в динамике развития таких микроэкологических систем в онтогенезе. Данная работа посвящена описанию количественной и качественной динамики фагов *E.coli* с высокой частотой детализации (3-7 дней) в кишечнике поросят раннего возраста, получающих экспериментальный препарат на основе нетрансдуцирующих фагов *E. coli*.

Методика. Для опыта сформированы две группы (по 3 животных) поросят в возрасте 17 дней. Животные второй группы получали на 27-й, 31-й, 35-й день жизни фаговый препарат, представлявший собой микстуру из пяти бактериофагов Т4-типа семейства *Muoviridae* с концентрацией $1,0 \times 10^8$ БОЕ/мл. В проведённых ранее опытах было установлено, что оптимальной схемой применения фаговых препаратов являлось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста. Учитывая это, мы давали на один приём животному давали 10 мл фаговой микстуры; таким образом, разовая доза фагов составляла $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову.

Производили периодический (с интервалом от 3 до 7 дней) отбор фекалий у 6 поросят 12 раз (всего 72 образца). Для качественной оценки спектра коли-фагов кишечного микробиоценоза свиней из чашек с посевом штаммов *E. coli* В и *E. coli* С600 и образовавшимися на них бляшками производили отбор чётких изолированных бляшек, отличавшихся наибольшим морфологическим разнообразием. Бляшки вырезали стерильной петлёй, после чего вносили в пробирки с 4 мл 4-х-часовой культурой соответствующего штамма, культивированного на жидкой среде LB. Затем культивировали при 37°C на качалке в течение 6,5 часов, после чего рост бактерий останавливали добавлением 0,1 мл хлороформа. Полученную взвесь фагов и лизированных бактерий освобождали от клеточного детрита центрифугированием при 14500 об/мин в течение 5 мин.

Результаты исследований и их обсуждение.

График динамики титра коли-фагов у поросят первых 3-9 недель жизни имеет следующие общие элементы вне зависимости от приёма фаговых препаратов: исходный (в 17 – 21 день) титр в пределах 3,73 – 5,11 lg БОЕ/г; снижение (до 3,53 lg БОЕ/г в группе I; до 0,33 lg БОЕ/г в группе II); подъём (до 4,76 lg БОЕ/г в группе I; до 3,12 lg БОЕ/г в группе II); окончательное (в 59 – 66 дней) снижение до 0,00 – 0,63 lg БОЕ/г. При этом характерно, что снижение и подъём оказались смещёнными: в группе I снижение и подъём отмечались на 24 и 31 день соответственно; в группе II – на 42 и 46 день соответственно (рис. 1).

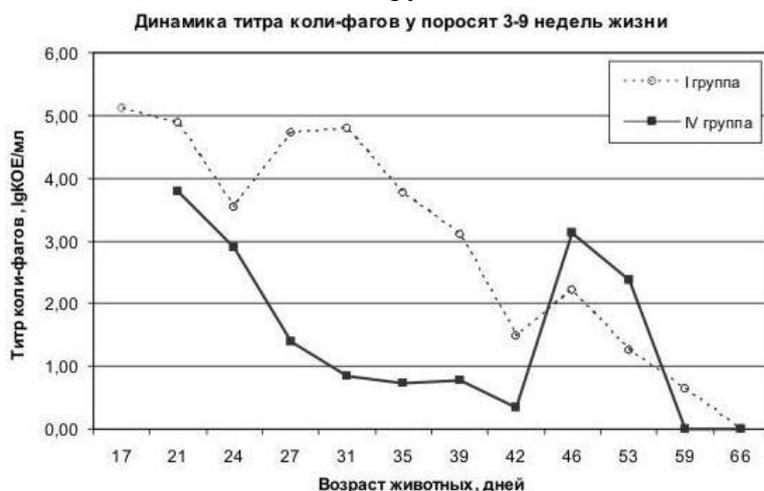


Рис. 1.

Среднее значение титра коли-фагов в течение всего периода наблюдения составило: в группе I – 2,96 lg БОЕ/г; в группе II – 1,48 lg БОЕ/г. Возможно, приём фагового препарата оказывает понижающее влияние на титр колифагов кишечника поросят.

Несмотря на приём фагового препарата, у двух из трёх животных II группы (получавших фаговый препарат) в день отъёма (35-й) не обнаруживались бактериофаги *E.coli*, в то время, как казалось ожидаемым значительное увеличение фагового титра за счёт «экзогенных» фагов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 11-04-96575-р_юг_ц; 12-04-90864-мол_рф_нр; 13-04-00991-а.

Список литературы:

1. Schroeder, B., Duncker, S., Barth, S., Bauerfeind, R., Gruber, A. D., Deppenmeier, S. & Breves, G. (2006). Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection. *Dig Dis Sci* 51, 724–731.
2. Maiden, M. 1998. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 27: S12-20.
3. Таяшин В.И., Зимин А.А., Боронин А.М. Котрансдукция плазмид системы рЕТ мутантами бактериофагов Т4 и RB43 // *Микробиология*. 2003. Т.72. №6. С.785-791
4. Таяшин В.И., А.А.Зимин, М.Г.Шляпников, Боронин А.М. Трансдукция детерминант антибиотикорезистентности плазмид псевдо-Т-четными бактериофагами // *Генетика*. 2003. Т.39. №7. С.914-926.
5. Зимин А.А., Васильева Е.А., Фишман К.С. Трансдукция плазмид бактериофагами Т4-типа: теоретические и практические аспекты. *Вестник новых медицинских технологий*. №1, 2009, 207-210.
6. Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. The Diversity of Coliphages and Coliforms in Horse Feces Reveals a Complex Pattern of Ecological Interactions. *Appl Environ Microbiol*. 2007 October; 73(19): 5975–5981.
7. Callaway, T., Edrington, T., Varey, P., Raya, R., Brabban, A., Kutter, E., Jung, Y., Genovese, K., Elder, R., Nisbet, D.J. (2003). Isolation of naturally occurring bacteriophage from sheep that reduce populations of *Escherichia coli* O157:H7 In Vitro And In Vivo. 5th International Symposium on 'Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections', O-16.

Каталог белков Нос бактериофагов подсемейства Teequatrovirinae

Зимин А.А.¹, Микулинская Г.В.², Назипова Н.Н.³

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² Лаборатория молекулярной биотехнологии ФИБХ РАН

³ Лаборатория биоинформатики Института математических проблем биологии РАН

Введение. Бактериофаги составляют наиболее многочисленную популяцию биологических существ на планете (1). Исследования показывают, что разнообразие в этой популяции бактериальных вирусов огромно (11), это обеспечивается активной ролью горизонтального переноса генетического материала, который наблюдается у бактериофагов. Таксономическая классификация бактериофагов является непростой задачей. Долгое время единственной была система Международного комитета по вирусной таксономии (ICTV, International Committee on the Taxonomy of Viruses) (6), которая основывалась на ряде физиологических и морфологических признаков организмов и природе их генетического материала (двухцепочечная или одноцепочечная ДНК, двухцепочечная или одноцепочечная

РНК). В начале 21-го века появились работы, в которых стали использоваться геномные последовательности, появились новые данные, характеризующие разнообразие бактериофагов (10, 11). В отличие от других видов организмов для бактериофагов невозможно использование генов рибосомальных РНК, этих универсальных для большинства биологических существ таксономических маркеров, потому что у них нет рибосомных РНК. Кроме того, было показано, что нет ни одного универсального белкового маркера, который можно было бы использовать для классификации бактериофагов. Геномная классификация фагов (Phage Proteomic Tree) была осуществлена на основе идеи о сходстве протеомов у родственных бактериофагов (11), она хорошо согласуется с таксономической системой ICTV. Авторы геномной классификации предположили, что для каждой ветви таксономического дерева фагов должны быть использованы разные белки в качестве маркеров.

Бактериофаг Т4 – большой вирус, инфицирующий *Escherichia coli* относится к подсемейству Teequatrovirinae семейства Myoviridae отряда Caudovirales (9). Он состоит из вытянутой икосаэдрической головки и сокращающегося отростка, заканчивающегося базальной пластинкой, к которой присоединены шесть длинных фибрилл. Головка (капсид), содержащая внутри себя геномную двухцепочечную ДНК длиной 170000 пар нуклеотидов (п.н.), построена из трех белков – продуктов генов 20, 23 и 24. Существуют также два декорирующих белка: Нос (от: head outer capsid protein) и Soc (от: small outer capsid protein), которые присоединяются уже к собранному капсиду (5;7). Белки Нос и Soc не требуются для сборки капсида. Белок Нос присоединяется к центру капсомера, образованного гексамерами белков 23; это не сказывается существенным образом на стабильности капсида (12). Анализ последовательности белка Нос бактериофага Т4 показал, что он состоит из четырех тандемных иммуноглобулин-подобных (Ig-подобных) доменов (2). Три первых домена имеют типичную Ig-подобную укладку, которая обычно состоит из семи β -цепей, уложенных в два антипараллельных β -листа, упакованных в β -сэндвич (3;5). Белки Нос различных бактериофагов, родственных Т4, гетерогенны по длине и могут содержать разное число доменов, сходных по аминокислотной последовательности и по структуре (4). (Всего их найдено 86 на 12.11.2015). Природа гетерогенности белков Нос, а также пути их формирования в нынешнем виде, могут быть исследованы путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей отдельных доменов. Такое исследование позволит провести классификацию фагов внутри подсемейства, а кроме того, пролить свет на пути эволюции белков Нос и других белков, содержащих повторяющиеся иммуноглобулин-подобные домены. Поиск белков, имеющих последовательности, сходные с отдельными доменами Нос, может помочь в установлении биологической функции этого белка.

Целью данной работы являлось уточнение классификации бактериофагов подсемейства Teequatrovirinae (родственных бактериофагу Т4) с использованием синтетического подхода, который основан на использовании основных идей упомянутых методов. Подсемейство Т4-подобных фагов Teequatrovirinae поделено по сходству аминокислотных последовательностей на 2 группы родов (фаги Т4-типа и KVP40-подобные вирусы). Мы исследовали каждую из этих групп, которая содержит 4 подгруппы (фаги Т4-типа, 44RR2.8-типа, RB43-типа, RB49-типа) (9). Мы изучали каждую подгруппу в отдельности.

Результаты. Разработанный здесь подход согласуется с известными методами классификации по геномным последовательностям (9) и основан на более естественных критериях. В качестве генетического маркера выбраны белки, содержащие иммуноглобулин-подобные домены. Эти маркеры существуют в геномах почти всех представителей подсемейства. Классификация, основанная на числе и качестве таких доменов, адекватна

общепринятым взглядам, согласно которым эволюционная связь между фагами маскируется горизонтальным переносом генетического материала.

Число иммуноглобулин-подобных доменов в белке Hoc разных бактериофагов подсемейства Tеequatrovirinae варьирует от одного до пяти и определяет антигенные свойства белка. Использование в качестве критерия для классификации бактериофагов количество доменов в белке Hoc приводит к разделению всех бактериофагов подсемейства на 7 групп:

- бактериофаги, имеющие однодоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие двухдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие трехдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие четырехдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие четырехдоменные варианты белка с С-концевым удлинением третьего домена,
- бактериофаги, имеющие пятидоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие шестидоменные варианты белка.

Выводы. 1. Филогенетическое дерево бактериофагов, родственных T4, построенное по отдельным доменам белков-продуктов генов hoc образует три основные ветви. Это ветвь С-концевых доменов, ветвь N-концевых доменов и ветвь промежуточных доменов. **2.** Обязательное присутствие С-концевого домена во всех белках Hoc указывает на его функциональную и структурную значимость для формирования белка и его прикрепления к капсиду фага. Сходство этого домена с адгезивными белками – селектинами и наличие в нем консервативной белковой последовательности ESRNG также косвенно свидетельствует о его участии в присоединении к капсиду. **3.** Сравнительный анализ доменной организации Hoc позволяет выделить три возможных пути эволюции его генов: а) внутригенная дупликация промежуточных доменов, б) перемешивание доменов при рекомбинации между генами hoc различных родственных фагов и в) дупликация гена двухдоменного варианта белка Hoc.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ №13-04-00991 и №15-07-05783.

Список литературы:

1. Balter M. Virology. Evolution on life's fringes. Science. 2000. V. 289. P. 1866-1867.
2. Bateman A., Eddy S.R., Mesyanzhinov V.V. A member of the immunoglobulin superfamily in bacteriophage T4. Virus Genes. 1997. V. 14. P. 163-165.
3. Bork P., Holm L., Sander C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. J. Mol. Biol. 1994. V. 242. P. 309-320.
4. Fokine A., Islam M.Z., Zhang Z., Bowman V.D., Rao V.B., Rossmann M.G.. Structure of the three N-terminal immunoglobulin domains of the highly immunogenic outer capsid protein from a T4-like bacteriophage. J. Virol. 2011. V. 85. № 16. P.8141-8148.
5. Halaby D.M., Poupon A., Mornon J. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. Protein Eng. 1999. V. 12. P. 563-571.
6. ICTV Virus Taxonomy: 2011 Release (current). URL: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011> (дата обращения 12.11.2012).
7. Ishii T., Yamaguchi Y., Yanagida M. Binding of the structural protein Soc to the head shell of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 1978. V. 120. P. 533-544.
8. Ishii T., Yanagida M. The two dispensable structural proteins (Soc and Hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro. J. Mol. Biol. 1977. V. 109. P. 487-514.
9. Lavigne R., Darius P., Summer E.J., Seto D., Mahadevan P., Nilsson A.S., Ackermann H.W., Kropinski A.M. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. BMC Microbiol. 2009. V. 9. Article No. 224.

9. Lawrence J.G., Hatfull G.F., Hendrix R.W. Imbroglis of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 4891-4905.
Rohwer F., Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 16. P. 4529-4535.
10. Ross P.D., Black L.W., Bisher M.E., Steven A.C. Assembly-dependent conformational changes in a viral capsid protein. Calorimetric comparison of successive conformational states of the gp23 surface lattice of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 1985. V. 183. P. 353-364.

Исследование экспрессии гена 1 бактериофага Т4 под контролем промотора гена 10 бактериофага Т7 в биплазмидной системе при температуре 37 - 50°C

Зимин А.А.¹, Феофанов С.А.², Васильева Е.Л.¹

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² Группа технологии синтеза нуклеиновых кислот и их компонентов ФИБХ РАН

Введение. Одной из наиболее популярных систем экспрессии генов является система экспрессии под контролем промотора гена 10 бактериофага Т7. Эта система разрабатывалась одновременно двумя группами исследователей: Ф. Стадiererом с сотрудниками и Ч.Ричардсоном с сотрудниками. Обе разработанные системы во многом сходны, но используемые в них генетические элементы как одни и те же, так и разные. В мире более популярна система Ф. Стадиера (2). В этой системе наиболее популярным методом является экспрессия клонированного гена в штамме *E.coli* BL21(DE3), где экспрессия РНК-полимеразы бактериофага Т7, необходимой для транскрипции целевого гена, контролируется промотором лактозного оперона *E.coli*. При этом ген 1 бактериофага Т7 находится в составе лямбда профага с иммунитетом фага 21 в составе генома бактерии. В системе С. Тейбора и Ч.Ричардсона (3) ген 1 бактериофага Т7 находится в плазмиде под контролем левого промотора бактериофага лямбда и термочувствительного мутантного варианта репрессора CI₈₅₇. В этом случае индуктором экспрессии служит тепло. Классический температурный интервал для таких мутантов - это 30-42(44) градуса Цельсия. Но экспрессия может достаточно эффективно осуществляться и при температурах ниже 42°C, но выше 30°C. Таковы свойства данного мутантного репрессора. Неисследованным температурным интервалом остаются температуры выше 44°C и ниже 50°C. С одной стороны это температуры при которых прекращается рост *E.coli* и денатурирует часть белков, с другой стороны многие белки остаются при этих температуре нативными и продолжают функционировать. Надо учесть и тот фактор, что денатурация белков в цитоплазме *E.coli* может происходить по законам, сильно отличающимся от денатурации в растворе *in vitro* (1). Возможная суперпродукция при повышенных температурах может использоваться: для получения денатурированных белков, например антигенов, которые применяются денатурированными; при получении белков нормальных бактерий и других организмов, остающихся нативными при таких температурах; для синтеза белков термоустойчивых бактерий (организмов) в данной системе в *E.coli*.

Целью данной работы было изучение экспрессии гена 1 бактериофага Т4 при температурах 37 – 50 градусов Цельсия в биплазмидной системе Тейбора-Ричардсона. В данной работе целевым белком является дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназа –

продукт гена 1 бактериофага T4, синтез которого зависит от работы гена 1 бактериофага T7. Этот фермент является ключевым на первой стадии ферментативного синтеза дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. дНТФ в свою очередь используются в современных тест-системах, основанных на полимеразной цепной реакции, а также в молекулярно-биологических исследованиях. Ген 1 бактериофага T4 находится в составе экспрессионного вектора pT7-5.

Результаты. Чтобы изучить влияние температуры на экспрессию гена 1 бактериофага T4 была воспроизведена биплазмидная система Тейбора-Ричардсона. Для этого провели трансформацию рекомбинантной плазмиды pT75-210, отобранной ранее, в компетентные клетки *E.coli* штамма С600. Полученные трансформанты переносили в среду LB, в соответствии с выбранной методикой, и инкубировали в течение 2,5 и 5 часов при различных температурах. Так как нижней границей температурного интервала экспрессии классически считается 30(42)°С (что связано со свойствами термочувствительного репрессора cI_{857}), для исследования нами были выбраны следующие температуры: 22, 30, 37, 42, 45, 46, 48 и 50°С. Пробы отбирали после 2,5 и 5 часов инкубации. Также был поставлен эксперимент по индукции в течение 10 часов при 37°С. Для анализа также использовали электрофорез в ПААГ. Анализ изображений полиакриламидных гелей проводили с помощью программы GelPro3.1. Данная программа позволяет оценить процент выхода исследуемого белка относительно всего спектра, представленного на электрофореze. Полученные с помощью такой обработки результаты нельзя расценивать как количественные из-за действия многих факторов. Однако с помощью этой программы можно качественно оценить результаты, сопоставить их и сделать выводы о варьировании количества изучаемого белка в зависимости от условий опыта, что имеет значение для понимания общей картины эксперимента при условии, что не требуется количественная оценка результатов.

Полученные таким образом результаты в целом оправдали ожидания. Как и предполагалось, при температурах, обеспечивающих нормальное функционирование белка-репрессора C1_{857} , не наблюдается синтез дНМФкиназы (22-30°С). При 37°С содержание дНМФ-киназы в пробе составило в среднем (по результатам трех проб) 10,7%; при 43°С – 13,4%; при 46°С (среднее для трех проб) – 16%; при 48 °С (среднее для двух проб) – 18,3%; при 50°С – 19,5%. При этих температурах происходит инактивация белка-репрессора, что ведет к транскрипции гена1 бактериофага T7, а это в свою очередь обеспечивает транскрипцию гена1 бактериофага T4. наблюдается выраженное повышение выхода дНМФ-киназы с увеличением температуры. Несмотря на то, что температуры выше 44°С подавляют рост *E.coli*, продолжается накопление белка. Это может быть связано с тем, что некоторые белки при этих температурах остаются нативными и продолжают функционировать.

Индукция температурой 50°С приводит к увеличению выхода продукта в 1,5 раза по сравнению с индукцией 43°С – температурой, наиболее часто используемой другими исследователями для получения целевого белка в подобных системах. Таким образом повышенные температуры могут применяться для получения различных белков в большом количестве (до 25% от всего белка клетки) с использованием системы Тейбора-Ричардсона в научных целях и в промышленности. Эксперименты на чашках для 37°С также показали высокий выход продукта: 12% в среднем для двух проб. Низкий показатель продукции белка в аналогичном эксперименте при индукции 43°С можно объяснить возможной ошибкой опыта, которая вполне могла произойти, так как нет

разработанной методики проведения подобных экспериментов, кроме предложенной нами.

Выводы.

1. Показали, что экспрессия этого гена при температуре 30°C не происходит. При индукции температурой 37°C выход продукта составляет около 10% от всего белка клетки, а при 43°C – около 13%.

2. Анализ работы системы экспрессии при температурах критичных для жизни клеток *E.coli* показал увеличение выхода продукта с увеличением температуры: 46°C – 16%, 48°C – 18%, 50°C – 20% от всего белка клетки.

3. Эксперимент на твердой агаризованной среде при индукции температурой 37°C показал выход продукта в районе 12% от белка клетки, что делает возможным использование этого сравнительно простого метода, например, в анализе клонов по экспрессии для последующей суперпродукции.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ №13-04-00991-а.

Список литературы.

1. Markaryan A., Zaborina O., Punj V., Chakrabarty A.M. Adenylate kinase as a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* // *Journal of Bacteriology*. 2001. Vol.183. №11. P.3345-3352.
2. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // *Methods Enzymol*. 1990. Vol. 185. P.60-89.
3. Tabor S., Richardson C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes // *Proc. Natl. Sci. USA*. 1985. Vol. 82. P.1074-1078.

РНК-лигаза 2 бактериофага T4: исследование активности гомогенного фермента при использовании в качестве субстрата ДНК-олигонуклеотидов

Зимин А.А., Савельева Н.В., Шляпников М.Г., Ванькова О.Е.

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Введение. Ранее было известно, что бактериофаг T4 кодирует две полинуклеотидлигазы. Одна из них - продукт гена 30 - ДНК-лигаза. Другая – продукт гена 63, который является РНК-лигазой и одновременно служит структурным компонентом базальной пластинки бактериофага. Оба фермента способны к лигированию не только своих канонических, но и альтернативных субстратов: в случае Gr30 это цепи рибонуклеотидов, в случае Gr63 – дезоксирибополинуклеотиды (1-3). В ходе анализа и реаннотирования области генома бактериофага T4 *uvrW-segD* найдено сходство полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания 24.1, с РНК-лигазами митохондрий паразитических простейших, участвующими в редакции матричных РНК. Этот процесс приводит к появлению новых иницирующих и/или стоп-кодонов в матричной РНК (4,5).

Одновременно с нашей работой рядом авторов в 2002 году было обнаружено, что ген данной предполагаемой РНК-лигазы является ранним геном, хотя находится в окружении поздних генов бактериофага (6). Также было показано, что рекомбинантный фермент с добавлением шести гистидинов к N-концу белка способен к лигированию олигонуклеотидов РНК (7,8).

Целью работы было клонирование гена новой РНК-лигазы бактериофага Т4, очистка данного фермента и исследование его субстратной специфичности.

Результаты. ОРС 24.1 была клонирована нами в составе ПЦР-фрагмента ДНК в вектор для суперпродукции рЕТ15b. Для изучения экспрессии клонированных генов под контролем промотора десятого гена бактериофага Т7 полученными рекомбинантными плазмидами был трансформирован штамм E.coli BL21, лизогенный по бактериофагу лямбда DE3. В этом производном бактериофага лямбда ген 1 бактериофага Т7 находится под контролем lacUV5-промотора. Были проведены опыты по индукции экспрессии гена 24.1 с помощью добавления ИПТГ, который снимает репрессию с данного промотора. Анализ индуцированных клеток с помощью белкового электрофореза в ПААГ при денатурирующих условиях выявил появление на геле полосы белка размером около 40 кДа, соответствующим молекулярной массе белка Gr24.1 (37,6 кДа) (9). В качестве контроля использовали клетки, трансформированные вектором рЕТ15b. Фермент накапливался в клетках до 30% от белка клетки.

Для препаративной наработки биомассы суперпродуцента сначала были подобраны оптимальные условия экспрессии. Индукцию экспрессии проводили при различной температуре (30° и 37° С) и варьировали время от 0,5 до 5 часов. Анализ отобранных проб с помощью электрофореза в денатурирующих условиях показал, что максимальный выход наблюдался при проведении индукции при 37°С в течение 2,5 часов.

Gr24.1 был очищен до гомогенного состояния с помощью ионообменной хроматографии. Для очистки исследуемого белка методом хроматографии на микроколонках были использованы ионообменные смолы DEAE-целлюлоза и фосфоцеллюлоза P11.

Поскольку для других двух полинуклеотидлигаз бактериофага Т4 показана способность к лигированию неканонических субстратов (1-3), нами было выдвинуто предположение, что вторая РНК-лигаза фага тоже может лигировать ДНК. Для проверки этой гипотезы мы проводили реакцию лигирования химически синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов размером 39-41 оснований.

Реакцию лигирования проводили в 1х буфере для Rnl2 (10х содержал: 1М Трис-ацетат, 0,5М дитиотриэтол, 0,5М MgCl₂). Время реакции варьировало от 30 минут до 45 часов, температура от 19 до 37°С. Были использованы следующие олигонуклеотиды.

A3(39) 5' - TGACGTTGCTGACAACGGTACCCTGTTCCCTGGGTATCCT - 3'
A4(41) 5'-GAAAAACTGGAAGAAGAGTCCGACCGTAAAATCATGCAGT-3'
D9(40) 3`- GGGACAAGGACCCATAGGACTTTTTGACSTTTCTTCT CAG - 5'
A1(30) 5`-CTGAACATATGCAGGACCCGTACGT TAAAG-3'

Электрофорез нуклеиновых проводили в денатурирующих условиях в вертикальных полиакриламидных гелях. Пробы перед нанесением смешивали с 2х буфером для нанесения (90% формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,01% бромфеноловый синий) и кипятили в течение 5 мин.

Было показано, что короткие дезоксирибоолигонуклеотиды могут быть сшиты очищенным ферментом. Для этого нами была подобрана специальная тест-система из трех олигонуклеотидов: A3, A4 и D9. Один из этих трех олигонуклеотидов служил матрицей для двух других (D9). Из двух комплиментарных данной матрице олигонуклеотидов только один был фосфорелирован (A4). Все остальные 5'-концы олигонуклеотидов в данной системе не были фосфорелированы. Это должно было обеспечивать только лигирование двух олигонуклеотидов, которые были «отожжены» к олигонуклеотиду-матрице. Исследуются условия лигирования более протяженных фрагментов ДНК.

Путем сравнения с базами данных было показано, что ряд белков, кодируемых E.coli и плазмидами имеет сходство с другими субъединицами РНК-редактирующего комплекса митохондрий одноклеточных паразитов.

Это позволяет предложить, что данный фермент может выполнять РНК-редактирующую функцию только в штаммах, содержащих плазмиды. В бесплазмидных штаммах он мог бы функционировать и как ДНК-лигаза, репарирующая одноцепочечные разрывы в ДНК в процессе развития бактериофага.

Выводы.

1. Ген второй РНК-лигазы бактериофага Т4 был амплифицирован с помощью ПЦР и клонирован под контроль промотора гена десяти бактериофага Т7 в плазмидный вектор рЕТ-15b. Индукция клонированного гена в штамме E.coli BL21 с помощью ИПТГ приводила к суперпродукции РНК-лигазы II, которая накапливалась в клетке в растворимом состоянии.

2. Были исследованы условия суперпродукции фермента, исследован температурный режим (30°C и 37°C) и время выращивания, было показано, что максимальное количество фермента накапливается в клетках при 37°C за 2,5 часа после индукции, при этих условиях было проведено препаративное выращивание и получение биомассы для очистки. Были исследованы условия очистки фермента с помощью DEAE-целлюлозы и P11 фосфоцеллюлозы и было найдено, что РНК-лигаза II элюируется при концентрации NaCl 0,1 – 0,2 М и 0,3 – 0,4 М, соответственно. Фермент был очищен двумя способами, до 95% чистоты.

3. Исследована реакция лигирования ДНК-олигонуклеотидов с помощью второй РНК-лигазы бактериофага Т4. Показано, что добавление РНК-лигазы II к смеси трех ДНК-олигонуклеотидов, один из которых комплементарен двум другим, в присутствии АТФ, приводит к появлению ДНК-олигонуклеотидов - продуктов лигирования ДНК.

Данная работа была частично поддержана средствами гранта РФФИ № 13-04-00991-а.

Список литературы:

1. Sano H., Feix G. Biochemistry, 13, 5110-5121 (1974).
2. Ohtsuka E. et al. Eur. J. Biochem, 81, 285-291 (1977).
3. McCoy M.I.M, R.Gumpert. Biochemistry, 19, 635-642 (1980).
4. Estevez A., Simpson L. Gene 240, 247-260 (1999).
5. Kable M.L. et al. TIBS, 22, 162-166 (1997).
6. Luke K. et al. Virology 299, 182-191 (2002).
7. Ho C.K., Shuman S. PNAS, 99, 20, 12709-12714 (2002)
8. Yin S. et al. J Biol Chem. 278, 20, 17601-17608 (2003).
9. Miller E.S. et al. Mol. Cel. Biol. Reviews 67, 1, 86-156 (2003).

Сравнительная геномика T4-подобных бактериофагов (*Myoviridae*, *Caudovirales*), выделенных из желудочно-кишечного тракта свиней

*Зимин А.А.¹, Кудрявцева А.В.², Василенко О.В.¹, Салямов В.И.¹,
Летаров А.В.³, Летарова М.А.³, Куликов Е.Е.³, Скобликов Н.Э.⁴*

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² Лаборатория постгеномных исследований Институт молекулярной биологии им В.А.Энгельгардта РАН, г.Москва

³ Лаборатория вирусов микроорганизмов Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, г.Москва

⁴ Лаборатория микробиологии ГНУ СКНИИЖ, г. Краснодар

Введение. В настоящее время бактериофаги используются в качестве лечебных средств при разных бактериальных инфекциях. Использование бактериофагов в качестве средства антибактериальной терапии сельскохозяйственных животных представляется одной из перспективных альтернатив применению антибиотиков, использование которых в животноводстве служит источником распространения генов лекарственной резистентности среди патогенных микроорганизмов. Одно из перспективных направлений работ в этом направлении - это разработка кормов с бактериофагами для профилактики кишечных инфекций животных. К настоящему времени нами сконструированы и подготовлены к масштабным испытаниям на фермах препараты с бактериофагами для профилактики и лечения колибактериозов свиней. Для более полного понимания роли бактериофагов в развитии микробиозноза у свиней в онтогенезе мы поставили задачу изучения их биоразнообразия методами полногеномного секвенирования.

Методика. Для опыта были сформированы две группы (по 3 животных) поросят в возрасте 17 дней. В течении 180 дней выращивания мы производили периодический (с интервалом от 3 до 7 дней) отбор фекалий у 6 поросят 12 раз (всего 72 образца). Для качественной оценки спектра коли-фагов производили посев на чашки с газонами штаммов *E. coli* В и *E. coli* С600 и производили отбор, стараясь охватить весь спектр их морфологического разнообразия. Фаги очищали повторным выделением отдельных бляшек и получали фаговую ДНК. Секвенирование производили на приборе GS Junior (Roche, Швейцария). Аннотирование геномов проводили программами RAST (4) и Prokka (5).

Результаты. Были обнаружены геномы бактериофагов семейств *Myoviridae* и *Podoviridae*. Ряд собранных контигов соответствовал по длине полным геномным последовательностям фагов групп RB49 и T4. Нами были определены 12 последовательностей T4-подобных бактериофагов среди фагов, отобранных у поросят во время выкармливания. Мы провели исследование этих последовательностей с помощью программы BLASTn на сервере NCBI, используя в качестве базы данных GenBank. Мы определили, что 7 исследованных геномов относятся T4-подобным бактериофагам группы бактериофага RB49, а 5 геномов принадлежат к T4-подобным бактериофагам группы бактериофага T4. Для визуального представления филогенетических взаимоотношений исследуемых бактериофагов мы построили дерево сравнения полных геномов. Дерево строилось без полногеномного выравнивания, дистантным методом. Использовалась программа JSpecies v.1.2.1 (2), которая сравнивает геномы попарно, вычисляя среднее нуклеотидное сходство (ANIb, в %). Его преобразовывали в относительную межгеномную дистанцию (100%- ANIb). По матрице дистанций строили дерево при помощи пакета

программ MEGA 6 статистическим методом neighbor-joining (3). Концепция и методики расчета ANI изначально были предложены для прокариотических геномов, а в данной работе этот подход впервые применен для вирусов. Дерево представлено на рисунке 1.

Наблюдения. Первичный анализ геномов позволил сделать ряд наблюдений. Штаммы фагов группы RB49 условно можно разделить на две группы, при этом они весьма сходны между собой и референсным геномом. В то же время геномы фагов группы T4 тоже можно разделить на две группы, но часть из них сильнее отличаются от референсного генома, чем геномы фагов группы RB49. Различия между штаммами обусловлены не столько мутациями, сколько рекомбинацией, затрагивающей большие участки геномов, при этом различающиеся участки сходны с геномами различных фагов группы T4-подобных фагов, что может быть обусловлено рекомбинацией при совместном заражении клетки хозяина. Наиболее частые отличия — замены генов эндонуклеаз и генов белков хвоста фага. Встречаются также отличия в количестве генов tRNA и вставки мобильных элементов сходных с I-TevII.

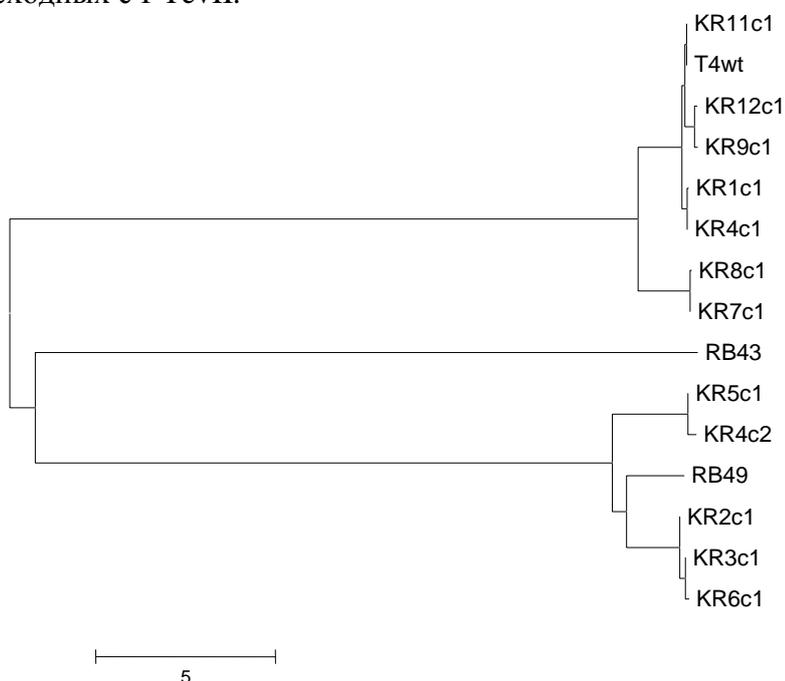


Рис. 1. Филогеномное дерево для двенадцати T4-подобных бактериофагов: KR11c1, KR12c1, KR9c1, KR1c1, KR4c1, KR8c1, KR7c1, KR5c1, KR4c1, KR2c1, KR3c1, KR6c1. Кладистический анализ поведен с помощью метода Neighbor-Joining [1]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с помощью программы JSpecies v.1.2.1 [2]. Построение дерева было проведено с помощью пакета программ MEGA6 [3]. Сумма длины ветвей дерева = 0.91513425. Масштаб указан в процентах отличий

Заключение. В настоящее время нами полностью завершена аннотация этих геномов и проводится сравнительный анализ протеомов (транслированных CDS's) с построением филогенетических протеомных деревьев и сравнительный анализ генетических карт исследуемых фагов на основе выравнивания всех обнаруженных белков, что может позволить более детально оценить вклад рекомбинационного процесса в популяционную динамику бактериофагов этой группы в кишечном биоценозе свиней.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ №13-04-00991 и субсидией Минобрнауки РФ RFMEFI60714X0093.

Список литературы:

1. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
2. Richter M, & Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(45):19126-31.
3. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, and Kumar S MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* (2013) 30: 2725-2729.
4. Aziz R.K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology *BMC Genomics* 2008, 9:75
5. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014 Jul 15;30(14):2068-9.

Масс-спектрометрическое изучение биodeградации и трансформации фенантрена плазмидосодержащими ризосферными бактериями *Pseudomonas aureofaciens*

**Зякун А.М.¹, Кочетков В. В.², Захарченко В.Н.¹, Баскунов Б.П.¹,
Пешенко В.П.¹, Лауринавичюс К.С.¹, Сиунова Т.В.²,
Анохина Т.О.², Боронин А.М.²**

¹ Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН

² Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

Изучена эффективность процессов биodeградации и трансформации фенантрена у ризосферного штамма *P. aureofaciens* BS1393, содержащего (1) природную конъюгативную плазмиду биodeградации нафталина pOV17, детерминирующую полное окисление нафталина; и (2) мутантную конъюгативную плазмиду NPL-41, контролирующую только первичные этапы окисления нафталина до салициловой кислоты. Анализированными показателями служили динамика роста бактериальных культур на фенантрене в качестве единственного источника углерода, продукция метаболической углекислоты, потребление молекулярного кислорода и биосинтез промежуточных продуктов окисления фенантрена, а также удельная скорость продукции CO₂ и лаг период наблюдаемой активности потребления фенантрена.

Основными метаболитами, наблюдаемыми при росте бактерий на фенантрене, были: (а) продукт начального гидроксирования цис-1,2-дигидродиол фенантрена с м.в. 244 (в масс-спектре отрицательных ионов с m/z 243), (б) 1-гидрокси-2-нафтойная кислота с м.в. 188 (с m/z 243) и (в) салициловая кислота с м.в. 138 (с m/z 137).

По наличию промежуточных метаболитов при микробной деградации фенантрена определены лимитирующие стадии этого процесса бактериями, несущими разные плазмиды. При потреблении фенантрена бактериями *P. aureofaciens* BS1393(pOV17) метаболит (а) наблюдали с начала и до завершения 14-суточной экспозиции, в то время как при росте бактерий *P. aureofaciens* BS1393(NPL-41) этот метаболит наблюдали в незначительном количестве лишь после 14-суточной экспозиции. Этот факт рассматривается как свидетельство лимитирующей стадии трансформации метаболита (а)

в возможный метаболит 1,2-дигидроксифенантрен. Наличие второго метаболита 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, регистрируемого при росте обеих культур, рассматривается как свидетельство ограничения скорости последующего декарбоксилирования этого метаболита при деградации фенантрена. Как известно, в процессе роста бактерий *P. aureofaciens* BS1393(NPL-41) на субстратах, содержащих ароматические структуры, в значительных количествах образуется салициловая кислота, которая является тупиковым их метаболитом. В тоже время при росте культуры *P. aureofaciens* BS1393(pOV17) на фенантрена салициловая кислота полностью отсутствует в культуральной среде, что рассматривается как свидетельство полного окисления фенантрена этими бактериями.

Использование сайт-специфичного распределения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ изотопов в дикарбоновых гидроксикислотах как показатель их биогенного и абиогенного происхождения

Зякун А.М., Захарченко В.Н., Баскунов Б.П., Пешенко В.П.

Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН

Органические моно- и дикарбоновые гидроксикислоты (винная, яблочная, лимонная, молочная, уксусная и др.), как продукты растительного и микробного биосинтеза, являются важными компонентами натуральных вин, соков и напитков и определяют их качество и органолептические характеристики.

Обнаружение дополнительного внесения в натуральные напитки и соки органических кислот абиогенного происхождения (например, химический синтез) может быть свидетельством отклонения от их стандартных показателей и сопровождаться непредсказуемыми последствиями их потребления (в особенности в детском питании).

Проблема идентификации источников происхождения органических гидроксикислот имеет огромное значение при оценке качества и выявлении как натуральной природы, так возможной фальсификации соков и винодельческой продукции.

Цель исследования: разработка методов определения особенностей внутримолекулярного распределения изотопов ^{13}C и ^{12}C в органических гидроксикислотах, как потенциальных показателей источников их происхождения.

Показано, что характеристики изотопного состава ($\delta^{13}\text{C}$) суммарного углерода винных кислот разного биогенного и абиогенного (химический синтез) генезиса варьируют в пределах от -25.6 ‰ до -22.0 ‰. Диапазон значений $\delta^{13}\text{C}$ суммарного углерода других оксикислот (например, яблочная кислота) составляет от -22.2 ‰ до -21.98 ‰ и в случае молочной кислоты - от -12.4‰ до -11.01‰. Продемонстрирована возможность определения оксикислот, источниками которых являются C_3 - и C_4 -тип растения.

Уникальным показателем, отражающим возможное различие источников происхождения моно- и дикарбоновых оксикислот, является разность между изотопными характеристиками углерода их алкильной части и карбоксильных групп ($\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{алкил}}$ –

$\delta^{13}\text{C}_{\text{BaCO}_3}$): величина $\Delta^{13}\text{C} < 0$ при биогенном происхождении и величина $\Delta^{13}\text{C} \geq 0$ при абиогенном происхождении (например, химический синтез).

Таким образом, предложена схеме и технология анализа внутримолекулярного распределения изотопов углерода (^{12}C , ^{13}C) в дикарбоновых гидроксикислотах, позволяющих выявлять источники их происхождения.

Биологически активные соединения грибов секции *Usti* рода *Aspergillus*

***Козловский А.Г.¹, Антипова Т.В.¹, Желифонова В.П.¹, Баскунов Б.П.²,
Иванушкина Н.Е.³, Кочкина Г.А.³, Озерская С.М.³***

¹ Лаборатория вторичных метаболитов ИБФМ РАН,

² Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН,

³ Лаборатория мицелиальных грибов Отдела ВКМ ИБФМ РАН

Одним из наиболее перспективных путей развития новых биологических технологий является оценка возможного использования доступных, поддерживаемых в различных специализированных коллекциях биологических ресурсов. Известно, что микроскопические грибы обладают значительным потенциалом синтеза различных органических соединений. Изучение биологического разнообразия этих организмов не только в таксономическом плане, но и в плане разнообразия биологически активных соединений, к синтезу которых они способны, несомненно, является актуальной задачей.

Представители секции *Usti* рода *Aspergillus* способны продуцировать большое число разнообразных вторичных метаболитов, многие из которых являются видоспецифичными маркерами [1]. Несмотря на то, что структуры многих вторичных метаболитов уже установлены, хемотаксономическое изучение аспергиллов показало, что у многих видов встречаются новые, ещё до конца не охарактеризованные метаболиты, изучение которых в будущем может привести к открытию новых биологически активных соединений.

Целью данного исследования было изучение спектра вторичных метаболитов у 23 штаммов из фонда ВКМ, относящихся к секции *Usti* рода *Aspergillus*, выделенных из различных местообитаний (пищевые продукты, почва, многолетнемерзлые грунты, строительный камень).

Обнаружено, что все изученные штаммы синтезировали вторичные метаболиты, химическая структура которых позволила отнести их к различным классам органических веществ, таких как дримановые сесквитерпеноиды (дриман 1, 2, 15), изохинолиновые алкалоиды (ТМС-120 А-С, производное 1), производные изохромана (пергиллин, псевдофлектусин), антрахиноновые пигменты верзиколориновой группы (аверуфин, верзиколорин С) и меротерпеноиды (аусталиды О и J). Кроме того, были обнаружены неизвестные индолсодержащие соединения, точную химическую структуру которых еще предстоит установить. Идентифицированные соединения по данным литературы обладают ярко выраженной биологической активностью. Некоторые из них рассматриваются как перспективные лекарственные препараты. Например, ТМС-120 были запатентованы как соединения, которые могут быть использованы в качестве селективных нейромедиаторов при лечении неврологических заболеваний [2]. Дримановые

сесквитерпеноиды рассматриваются в качестве лекарственных средств при лечении хронической сердечной недостаточности, легочной и артериальной гипертензии. Дриманы обладают цитотоксичностью и антимикробной активностью [3]. Для псевдофлектусина показана высокая цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам человека [4].

Современные методы фенотипической идентификации аспергиллов предполагают культивирование на наборе различных сред при разных температурах, с последующим описанием макро и микроморфологических признаков [1]. Такой подход позволяет лучше различить близкие виды. У изученных штаммов сравнительный анализ морфологических и физиологических признаков со спектром идентифицированных вторичных метаболитов позволил реидентифицировать отдельные штаммы. Показано, что идентифицированные нами вторичные метаболиты являются хемотаксономическими маркерами определенных видов грибов секции *Usti*. В частности, 20 исследованных штаммов в разные годы поступили в ВКМ под наименованием *A. ustus*. На основании комплексного изучения морфолого-физиологических признаков (скорость роста на спектре сред при разных температурах культивирования, особенности конидиогенных структур) и спектра вторичных метаболитов (аверуфин, верзиколин С, аусталиды) название *A. ustus* было сохранено для 5 штаммов, 14 были реидентифицированы как *A. calidoustus*, спектр метаболитов у них включал дриманы и ТМС-120. Один штамм на основании фенотипических физиологических характеристик соответствовал виду *A. ustus*, однако спектр его вторичных метаболитов, представленных пергиллиноподобными соединениями (пергиллин, псевдофлектусин), характерен для вида *A. insuetus*. Для уточнения диагноза этого штамма будут проведены дополнительные исследования.

Штаммы ВКМ F-1860 и ВКМ F-1861, поступившие в ВКМ как *A. insuetus* – переопределены как *A. pseudodeflectus*, близкий по морфологии вид, одним из важнейших диагностических признаков которого, в отличие от *A. insuetus*, является хороший рост при температуре 37°C (среда СУА). Спектр вторичных метаболитов этих штаммов, представленный только дриманами, подтвердил правильность реидентификации.

Наличие красного пигмента монаскорубраминовой природы у типового штамма *A. amylovorus* Panasenko ex Samson ВКМ F-906 соответствует литературным данным [1], однако в ходе нашего исследования дополнительно удалось обнаружить ранее не упоминавшиеся для данного штамма индолсодержащие соединения.

Таким образом, проведенная работа позволила выявить порядка 15 вторичных метаболитов, относящихся к различным структурным классам химических соединений. Для штаммов ВКМ, относящихся к роду *Aspergillus*, такие данные, имеющие прикладное значение, получены впервые. Проведена реидентификация изученных штаммов на основе современной полифазной таксономии грибов рода *Aspergillus*. Среди выявленных метаболитов обнаружены новые вещества, химическая природа которых будет детально изучена в дальнейшей работе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-29-02629 офи_м.

Список литературы:

1. Samson R.A., Varga J., Meijer1 M., Frisvad J.C. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. // *Studies in Mycology*. 2011. No. 69. P. 81–97.
2. Патент US 7084152. 2006.
3. Zhou H., Zhu T., Cai S., Gu Q., Li D. Drimane sesquiterpenoids from the mangrove-derived fungus *Aspergillus ustus* // *Chem. Pharm. Bull.* 2011. V. 59. № 6. P. 762-766.
4. Патент PCT/JP2005/007003.

Конвертерное накопление напряжения от биотопливного элемента на основе клеток *Glucanobacter oxydans*

**Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Китова А.Е.,
Ивахненко А.А., Решетилов А.Н.**

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Микробные биотопливные элементы (БТЭ) могут использоваться для электрического питания устройств низкой мощности (от 10^{-7} до 10^{-3} Вт/см²) [1]. Актуальной является задача повышения напряжения БТЭ для их более широкого применения. Так, последовательное и параллельное соединение нескольких БТЭ использовали в работе [2]. Другой пример применения БТЭ относится к области использования их как источников питания биосенсоров. Так, в работе [3] представлен биотопливный элемент, встроенный в контактную линзу человека и генерирующий энергию за счет использования глюкозы, находящейся в слезной жидкости человека, практически не меняя при этом ее содержания в организме. БТЭ генерировал напряжение холостого хода в 0.57 В при развиваемой мощности 1 мкВт/см². Авторы считают, что использование диагностического прибора на основе контактной линзы и содержащего глюкозный биосенсор было бы весьма полезно для больных с нарушенным обменом глюкозы. Этот пример также может относиться к режиму периодического использования маломощных БТЭ. В целом можно сделать заключение, что источники питания на основе БТЭ могли бы найти широкое применение как в немодифицированном виде, так и в случае, когда внешние дополнительные устройства смогли бы быть использованы для накопления генерируемой ими энергии.

Целью данного исследования являлась оптимизация работы системы «конвертер напряжения – БТЭ» для повышения выходного напряжения БТЭ. В качестве источника электроэнергии использовали микробный биотопливный элемент, обладающий микроваттной выходной мощностью.

В работе использовали штамм *Glucanobacter oxydans* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Измерительная ячейка представляла собой два последовательно включенных БТЭ с напряжением холостого хода для каждого ~250 мВ. В качестве электродов анода и катода использовали стержни спектрального графита диаметром 6 мм, которые погружали в раствор на глубину 5 см. Электролитическая связь анодной и катодной кювет одиночного БТЭ осуществлялась через отверстие в стенках анода и катода, закрытое протонпроницаемой мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия) площадью 25 см². В качестве базового раствора использовали 25 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6.0, с добавлением 10 мМ хлорида натрия. В качестве медиаторов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ) для анодного отделения (40 мкМ) и гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ) (4 мМ) для катодного (Sigma-Aldrich, Co). В качестве субстрата для окисления клетками *G. oxydans* использовался этиловый спирт. Во внешнюю цепь включали гальванопотенциостат (IPSMicro, «Кронас», Россия) или гальванопотенциостат VersaSTAT 4 (Ametek, Inc., США).

Комплекс конвертирования был представлен отладочным устройством bq25504 (Texas Instruments), к которому подключали источник энергии в виде микробного БТЭ, и измерительным устройством, сопряженным с персональным компьютером (ПК), оснащенным программой для регистрации данных 4-х канальное измерительное

устройство и программа для ПК были разработаны авторами исследования. Измерительное устройство имело высокое входное сопротивление для того, чтобы исключить шунтирующее влияние на режим накопления конвертером. Режим накопления энергии опробовали на конденсаторах емкостью 100, 1000 и 6800 мкФ (фирма SamYoung), а также ионисторе емкостью 1 Ф (фирма Panasonic).

Входное напряжение (V_{bat}) для конвертера в течение всего эксперимента сохранялось постоянным, что создавало благоприятные условия конвертирования (рис. 1). За счет оптимизации условий измерения (концентрация субстрата, медиаторов) время заряда конденсатора сократилось в 3 раза по сравнению с предыдущими экспериментами. Напряжение (V_{in}) на конденсаторе емкостью 6800 мкФ достигало значения ~ 3 В за 34 мин.

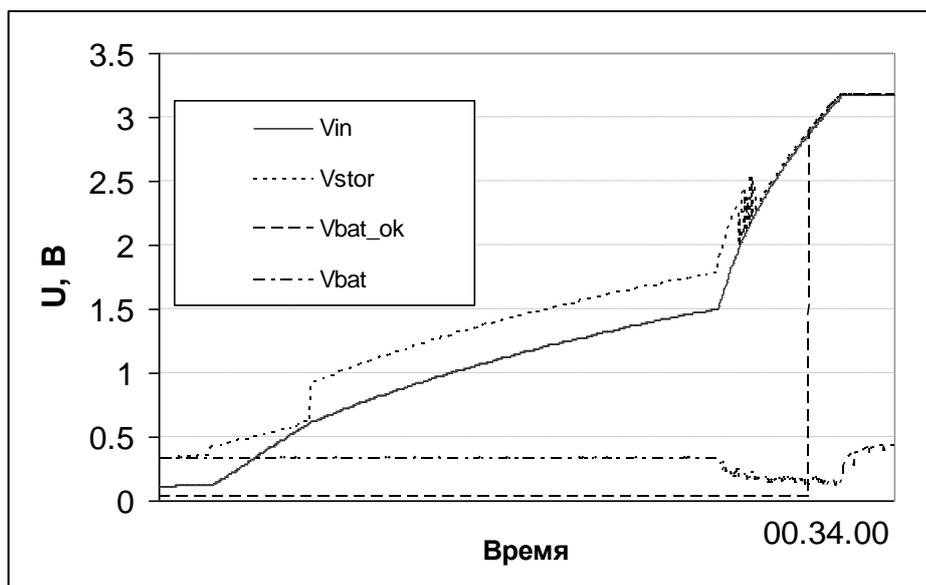


Рис. 1. Диаграмма накопления энергии на конденсаторе 6800 мкФ при использовании двух БТЭ, соединенных последовательно

В Таблице 1 приведено время заряда конденсаторов различными источниками энергии. Ионистор (1Ф) заряжается 1.5 мин элементом АА. Конденсатор емкостью 6800 мкФ заряжается двумя БТЭ за 25 мин. При последовательном соединении четырех БТЭ напряжение достигает своего максимального значения за 14 мин.

Таблица 1

Время заряда конденсаторов различными источниками энергии

Конденсатор	1000 мкФ		6800 мкФ		1Ф	
	Заряд	Разряд	Заряд	Разряд	Заряд	Разряд
Источник энергии						
Элемент АА	0.1 с	0.1 с	0.2 с	0.2 с	3.5 мин	1.5 мин
2 БТЭ последовательно	8 мин	0.1 с	25-35 мин	0.2 с	---	---
4 БТЭ последовательно	4 мин	0.1 с	15 мин	0.2 с	---	---
Элемент АГЗ	0.1 с	0.1 с	0.3 с	0.2 с	6.5 мин	4 мин

Работа была поддержана грантами РФФИ 13-07-12052 (ОФИ_М_2013).

Список литературы:

1. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development // Biosensors and Bioelectronics. 2006. V. 21. P. 2015-2045.
2. Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L. and E. Katz. Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams. // The Royal Society of Chemistry. Energy Environ. Sci. - 2012, DOI: 10.1039/c2ee23209j
3. Falk M., Blum Z., Shleev S. Direct electron transfer based enzymatic fuel cells // Electrochimica Acta. 2012. V. 82. P. 191– 202.

Безмедиаторное биоэлектрокаталитическое окисление этилового спирта на электроде из терморасширенного графита, модифицированного клетками *Glucanobacter oxydans* и их мембранными фракциями

Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетиллов А.Н.

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

В последнее время повышенное внимание уделяется разработке аналитических и энергетических систем на основе биоматериалов. Биотопливные элементы (БТЭ), относящиеся к таким системам, могут быть использованы для создания устройств питания низкой мощности. Сопряжение биокаталитической и электрохимической реакций можно осуществлять двумя способами: по прямому биоэлектрокаталитическому механизму и с использованием медиаторов электронного транспорта. В первом варианте электрод является донором или акцептором электронов, заменяя один из субстратов в ферментативной реакции. Во втором случае для усиления обмена электронами между электродом и активным центром биокатализатора в систему вводят диффузионно подвижный (как правило низкомолекулярный) редокс-медиатор. Безмедиаторный биоэлектрокаталитический процесс более предпочтителен тем, что значительно упрощает конструкцию измерительной системы [1].

Целью настоящей работы являлось изучение реакции электроокисления этанола мембранными фракциями и целыми клетками бактерий *Glucanobacter oxydans* ВКМ В-1280.

Материалом электрода являлся графеноподобный терморасширенный графит (ТРГ), имеющий высокую удельную поверхность и низкое удельное сопротивление [2]. Имобилизацию мембранных фракций (МФ) или целых клеток на поверхность электрода осуществляли включением в гель хитозана. Методами циклической вольтамперометрии и хронопотенциометрии изучены характеристики биоэлектродов.

На рис. 1-2 представлен характер изменения потенциала от времени, зарегистрированный для биоанода с иммобилизованными МФ (рис. 1) и целыми клетками (рис. 2) при добавлении в рабочий электролит этилового спирта или глюкозы. При внесении этилового спирта в рабочий электролит стационарный потенциал биоанода сдвигается в область отрицательных значений потенциала. Максимальное изменение потенциала рабочего электрода от исходного значения составляло около 60 мВ за 1000 с для МФ. Данный эффект может свидетельствовать о наличии в МФ бактерий *G. oxydans*

фермента, предположительно PQQ-зависимой алкогольдегидрогеназы, катализирующего электроокисление этилового спирта по механизму безмедиаторного биоэлектрокатализа. При внесении глюкозы наблюдали незначительные изменения потенциала как в случае МФ, так и для электрода на основе целых клеток. Максимальное изменение потенциала рабочего электрода на основе целых клеток от исходного значения составляло около 40 мВ за 1000 с.

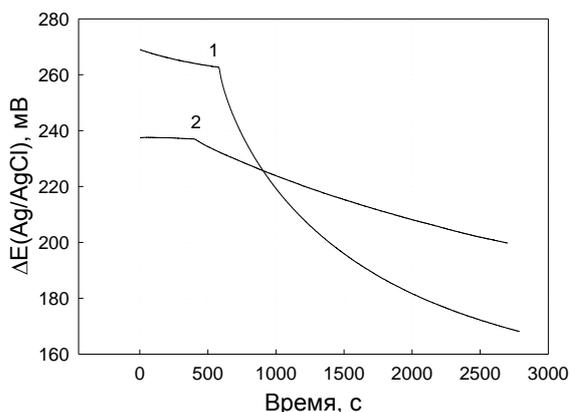


Рис. 1. Изменение стационарных потенциалов от времени для ТРГ-электродов с иммобилизованными МФ при добавлении в электролит этилового спирта (1) или глюкозы (2)

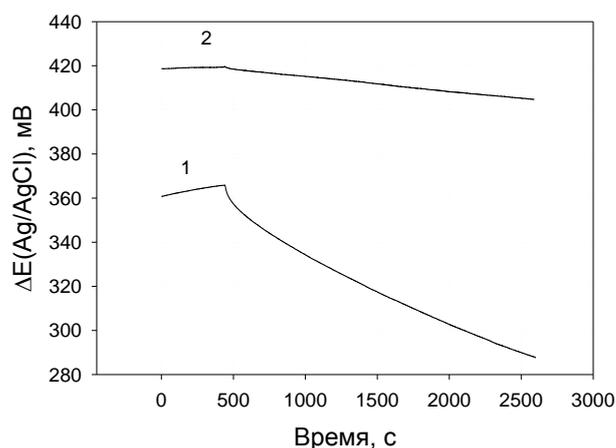


Рис. 2. Изменение стационарных потенциалов от времени для ТРГ-электродов с иммобилизованными клетками при добавлении в электролит этилового спирта (1) или глюкозы (2)

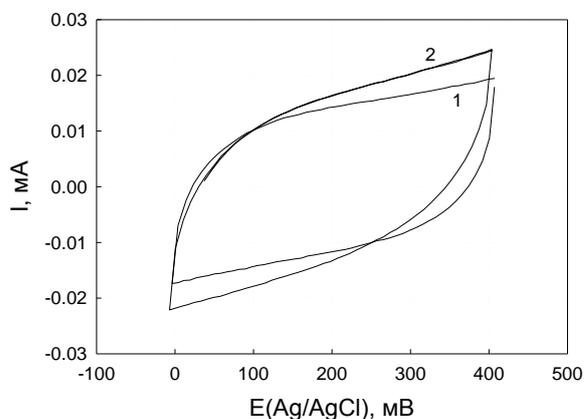


Рис. 3. ВАХ для ТРГ-электрода с иммобилизованными МФ в 30 мМ калий-фосфатном буферном растворе (1), pH 6.0 и в присутствии 10 мМ этилового спирта (2)

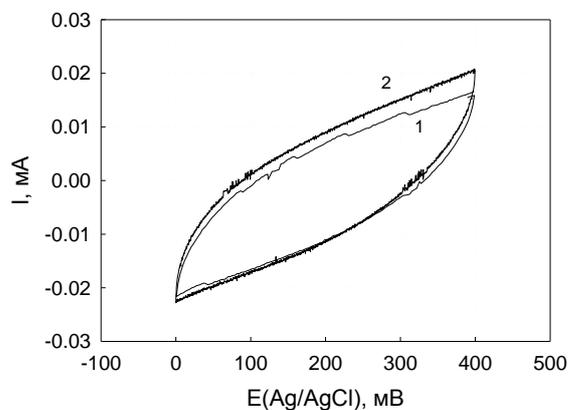


Рис. 4. ВАХ для ТРГ-электрода с иммобилизованными клетками в 30 мМ калий-фосфатном буферном растворе, pH 6.0 (1) и в присутствии 10 мМ этилового спирта (2)

На рис. 3-4 приведены циклические вольт-амперные характеристики (ВАХ), зарегистрированные для биоэлектродов с иммобилизованными МФ (рис. 3) и целыми клетками (рис. 4). Скорость изменения потенциала электрода составляла 3 мВ/с. В присутствии этилового спирта анодный ток увеличивается по сравнению с контролем при

отсутствии субстрата. Наблюдаемое увеличение анодного тока окисления этилового спирта являлось незначительным, что может быть связано с относительно невысокой концентрацией электрокаталитически активных центров на поверхности электрода или из-за недостаточной эффективности электронного транспорта между биокатализатором и электродом.

Таким образом, впервые получен биоэлектрод из терморасширенного графита на основе мембранных фракций и целых клеток бактерий *G. Oxydans*. Показано безмедиаторное биоэлектрокаталитическое окисление этилового спирта на ТРГ-электроде как целыми клетками *G. oxydans*, так и их мембранными фракциями. Разработанный биоэлектрод может быть использован в безреагентных биосенсорах или в качестве анода БТЭ.

Работа была поддержана грантами РФФИ 13-07-12052 (ОФИ_М_2013) и грантом «Биосенсоры и биотопливные элементы на основе электродов, модифицированных наноматериалами» Государственное Задание Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К.

Список литературы:

1. Ratautas D., Marcinkevičiene L., Meškys R., Kulys J. Mediatorless electron transfer in glucose dehydrogenase/laccase system adsorbed on carbon nanotubes // *Electrochimica Acta*. 2015. V.174. P. 940–944.
2. Горшенев В.Н., Илюшин А.С., Колесов В.В., Фионов А.С., Петрова Н.Г. Композиционные материалы на основе терморасширенного графита // *Перспективные материалы*, декабрь, 2008, спец. Выпуск (6), ч. 1, с 351-355.

Сравнение характеристик биоанодов в биотопливном элементе при модификации их углеродными наноматериалами

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

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Наиболее значимой тенденцией в области производства и снабжения энергией является минимизация расхода энергии и воздействия на окружающую среду. Одним из способов получения электрической энергии может быть генерация ее при помощи биокатализаторов и преобразования химической энергии в электрическую в биотопливных элементах (БТЭ). Так же, как любой обычный топливный элемент, БТЭ включает два электрода, анод и катод, один или оба которых являются биоэлектродами и содержат биокатализатор. Потребляя субстрат (топливо) биокатализатор анода выделяет электроны, которые участвуют в восстановлении кислорода на поверхности катода. Активность биокатализатора, иммобилизованного на поверхности электрода, является наиболее важным фактором для достижения высокой выходной мощности БТЭ. Одним из способов увеличения активности биокатализатора является модификация анода проводящими наноматериалами.

В данной работе исследовали влияние ряда углеродных наноматериалов на активность бактериальных клеток *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 при окислении этилового спирта в биотопливном элементе. Использовали следующие наноматериалы: спектральный графит (СГ), терморасширенный графит (ТРГ), высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ), многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ).

Основой биоанода являлся спектральный графит, на который наносилась смесь, состоящая из суспензии бактериальных клеток в геле хитозана и наноматериала. Сравнение электродов проводили по следующим критериям: сопротивление переноса заряда анода, вольтамперные характеристики анода, изменение этих параметров при внесении в систему медиатора и субстрата.

Измерения проводили в 25 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 6.5), содержащем 10 мМ хлорида натрия. Объем измерительной кюветы составлял 5 мл. Концентрация субстрата (этиловый спирт) в рабочем электролите составляла 10 мМ. В качестве редокс-медиатора использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (2,6-ДХФИФ) в концентрации 42 мкМ. Измерения спектральных импедансных характеристик проводили по трехэлектродной схеме в диапазоне от 40 кГц до 0,01 Гц, амплитуда сигнала составляла 10 мВ. Измерения проводили при двух потенциалах – напряжении холостого хода (НХХ) и в режиме короткого замыкания (режим замкнутой цепи, ЗЦ). Измерения вольтамперных и импедансных характеристик выполняли на гальванопотенциостате VersaSTAT 4 (Ametek Inc., США).

Вольтамперные характеристики. Полученные результаты показывают, что модификация электрода из спектрального графита многостенными углеродными нанотрубками приводила к уменьшению сопротивления электрода и существенному увеличению тока окисления в диапазоне 170-300 мВ (рис. 1). Модификация электрода другими исследуемыми наноматериалами не приводила к значительным изменениям характеристик электрода из спектрального графита, но значительно изменяла эти характеристики для электродов, приготовленных только из наноматериалов (ВОПГ, ТРГ). Некоторые данные приведены на рис. 1.

Хронопотенциометрия. Модификация электродов наноматериалами не приводила к резким изменениям в окислительной активности клеток, о которой судили по амплитуде генерируемого потенциала, что говорит о нетоксичности этих материалов для исследуемого штамма. Минимальные амплитуды сигнала были получены при использовании электрода из высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) и терморасширенного графита. При модификации электрода из спектрального графита этими наноматериалами амплитуда сигнала электрода также уменьшалась. Максимальные амплитуды сигнала наблюдали при модификации электрода из спектрального графита нанотрубками.

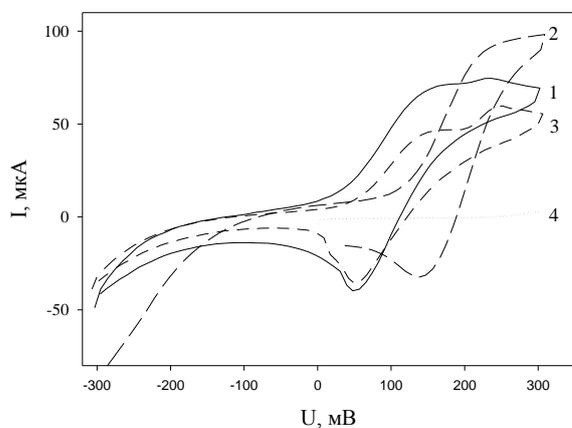


Рис. 1. Вольтамперные характеристики электродов из различных материалов по 3-х электродной схеме в присутствии медиатора 2,6-ДХФИФ (42 мкМ) и этилового спирта (10 мМ). 1 – СГ; 2 – МУНТ на СГ; 3 – ВОПГ на СГ; 4 – ВОПГ

Измерения методом импедансной спектроскопии. При измерениях по трехэлектродной схеме анод с иммобилизованными биоматериалами является единственным электродом, влияющим на электрохимические параметры ячейки, и при импедансных измерениях можно не учитывать влияние катода. Для описания процессов, происходящих в анодном отделении БТЭ была выбрана схема Рэндлса (рис. 2), которая наиболее точно описывала все исследованные электроды. Измерения по двухэлектродной схеме позволяют оценивать работу электродов непосредственно в биотопливном элементе. Эквивалентная схема для описания процессов в биотопливном элементе получается простым сложением двух схем Рэндлса. Для всех модифицированных электродов были получены диаграммы Найквиста (зависимость реальной и мнимой частей сопротивления от частоты), измеренные при потенциале холостого хода после установления равновесного состояния в системе до и после добавления субстрата. Максимальное значение сопротивления анода (R_a) (при НХХ) наблюдали для электрода из ВОПГ как до добавления субстрата, так и после него, а минимальное для электродов, модифицированных нанотрубками.

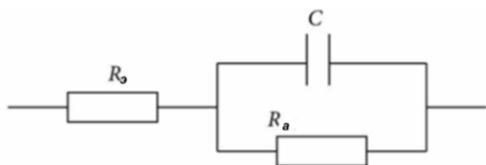


Рис. 2. Эквивалентная схема Рэндлса для процессов, происходящих в биотопливном элементе при измерениях по 3-х электродной схеме. R_e – сопротивление электролита; R_a – сопротивление анода

Таким образом, электрод из ВОПГ по всем своим характеристикам оказался непригодным для дальнейшего использования в БТЭ, а модификация этим наноматериалом электрода из спектрального графита ухудшала свойства спектрального графита. Модификация электрода из спектрального графита нанотрубками позволила улучшить параметры биоанода, что делает этот наноматериал перспективным для дальнейшего применения в микробных биотопливных элементах.

Работа поддержана грантом «Биосенсоры и биотопливные элементы на основе электродов, модифицированных нано-материалами» Государственное Задание Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К.

Структурно-функциональные перестройки плазмалеммы дрожжей

Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Колесникова С.А., Дмитриев В.В.

ВНТК трехмерных структур микроорганизмов ИБФМ РАН

Внутримембранные частицы (ВМЧ) вместе с инвагинациями являются основными элементами морфологии дрожжевой плазмалеммы (ПМ), выявляемыми методами электронной микроскопии. Функциональная роль инвагинаций у дрожжей не раскрыта до сих пор, хотя обнаружены они были давно (*Moor H., Muhlethaler K. J. 1963*). В данной работе на примере ряда дрожжей (*Saccharomyces lipolytica, Schwanniomyces occidentalis* и *Cryptococcus humicolus*) представлены результаты сравнительного цито-биохимического анализа адаптивных структурных изменений плазмалеммы в различных физиологических

ситуациях, которые свидетельствуют о значительной вариабельности морфологии ПМ в различных физиологических ситуациях.

Двум различным физиологическим состояниям *S. lipolytica* соответствуют два различных состояния ультраструктурной организации ПМ. В активном состоянии, когда клетки секретируют экзолипазу, плотность ВМЧ выше, а доля поверхности мембраны, занятой инвагинациями, ниже, чем в состоянии покоя (отсутствие липолитической активности) (Табл. 1 и 2). Поскольку ПМ *S. lipolytica* непосредственно вовлечена в процесс экзоцитоза липазы, можно предположить, что более высокая плотность ВМЧ и преобладание (до 80%) коротких инвагинаций с длиной около 200 нм (Рис. 1 б) связаны с липолитической активностью дрожжей (Рис. 1). С другой стороны, снижение плотности частиц и увеличение складчатости ПМ (см. Формула) вместе с удлинением инвагинаций можно рассматривать как структурный эквивалент снижения метаболической активности мембраны в результате инкубации в безуглеродном фосфатном буфере.

Складчатость плазмалеммы (стереологический параметр $S_{си}$) вычисляли по формуле:

$$S_{си} = \frac{P(L + 0.57nd)}{S_0 + (P - 2d)(L + 0.57nd)},$$

где $L = \sum_{i=1}^n l_i$ - общая протяженность инвагинаций, n - число складок, d - ширина инвагинаций, P - длина поперечного профиля складок.

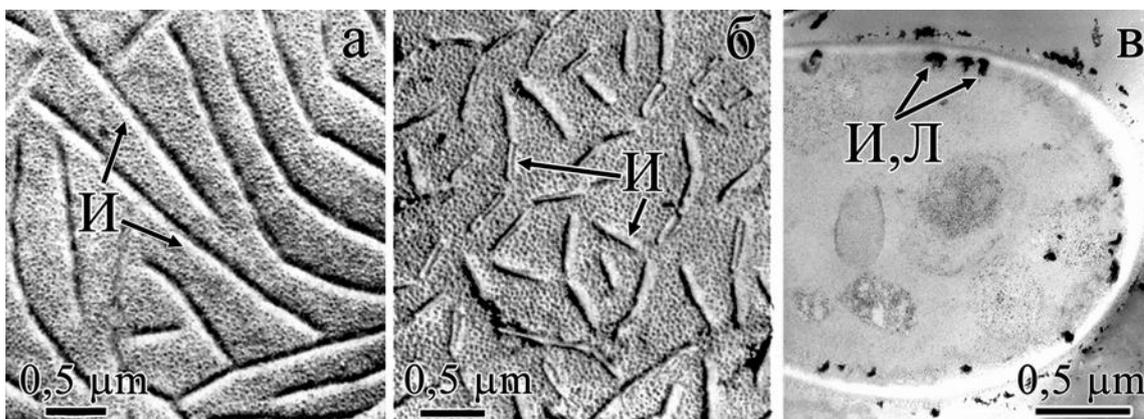


Рис 1. Криофрактографические сколы ПМ *S. lipolytica*: а- состояние покоя, б- липолитически активные клетки, в - ультратонкий срез, цитохимия на липазу. И- инвагинации, Л- продукт реакции на липазу

Таблица 1

Количественная характеристика инвагинационных структур ПМ *S. lipolytica*
в зависимости от состояния клеток

Состояние	Длина инвагинаций, l , нм	Ширина инвагинаций, d , нм	Длина поперечного профиля инвагинаций, P , нм	Складчатость плазмалеммы, $S_{СИ}$
Липолитически активные клетки	198	41 (3)	82 (8)	0,33 (0,05)
Покоящиеся клетки	608	41,5 (3)	92,7 (8,5)	0,50 (0,06)

Таблица 2

Плотность ($1/\mu\text{км}^2$) ВМЧ в плазмалемме *S. lipolytica* в зависимости от состояния клеток

Состояние	Гладкая поверхность плазмалеммы			Инвагинации EF
	EF	PF	EF+PF	
Липолитически активные клетки	703 (92)	2776 (261)	3539 (261)	5460 (893)
Покоящиеся клетки	401 (74)	2299 (173)	2700 (173)	5590 (817)

У *Schwanniomyces occidentalis* при замене углеводного субстрата на углеводородный наблюдается трансмембранное перераспределение ВМЧ (Рис 2, Табл. 3) т.е. переход из PF-плоскости в EF-плоскость. В зоне сферических инвагинаций (СИ) перераспределение ВМЧ происходит по трансмембранному и латеральному типу (т.е. более сложный). При этом по сравнению с остальной частью мембраны трансмембранный перенос частиц направлен в противоположную сторону: от EF к PF. С учётом того, что СИ являются частью «каналов», участвующих в первичной модификации углеводородного субстрата [1, 2], можно предположить что их структурная организация обусловлена активизацией секреторного процесса в этих зонах мембраны. Как известно [3], мембраны секреторных везикул встраиваются в ПМ, что, вероятно, и приводит к образованию СИ.

Формирование петлевидных инвагинаций (ПИ) у *Cryptococcus humicolus* (Рис. 3) при переносе их в среду с ПАВ (Лауроксом 9), вероятно, обусловлено адаптивными структурными перестройками клеточной оболочки для его утилизации. В пользу этого указывает тот факт, что ПИ были обнаружены исключительно только в лаг-фазе роста. В этот период происходит активизация везикулярных процессов, связанных с транспортом гидролаз клеточной стенки и гидролаз ПАВ, приводящая к резкому увеличению площади ПМ и временному образованию ПИ. Следует заметить, что обычные инвагинации, характерные для многих дрожжей, у *C. humicolus* не обнаруживаются ни при каких условиях. Утилизация ПАВ у этих дрожжей происходит с помощью экзогидролаз, равномерно распределённых снаружи клеточной стенки (по данным электронной микроскопии). Увеличение количества ВМЧ (Табл. 4) на PF – поверхности указывает на активное участие ПМ в секреторных процессах. В настоящее время проводится

реконструкция трёхмерной структуры ПИ, которая позволит выявить особенности этих образований плазмалеммы.

Таблица 3

Плотность ВМЧ (1/мкм²) на EF (наружная) и PF (внутренняя) поверхностях
скола ПМ *S. occidentalis* в зависимости от источника углерода

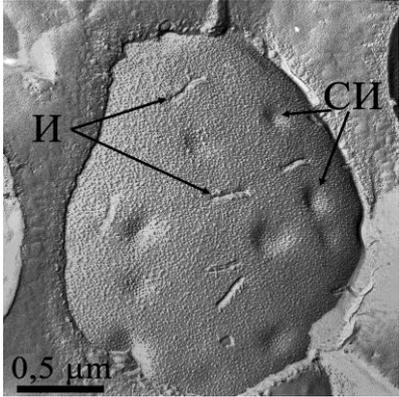
		Субстрат	
		Углеводороды	Глюкоза
		EF-поверхность	
	Гладкая поверхность	1350±175	700±135
	Сферическая инвагинация	700±110 с учетом кривизны поверхности	
		PF-поверхность	
Гладкая поверхность	3120±180	4450±250	
Сферическая инвагинация	3490±135 с учетом кривизны поверхности		

Рис 2. Криофрактографический Скол плазмалеммы *S. occidentalis*. СИ – сферические инвагинации, И – инвагинации

Таблица 4

Плотность внутримембранных частиц на EF- и PF- поверхностях
плазмалеммы *C. humicolus* в зависимости от источника углерода

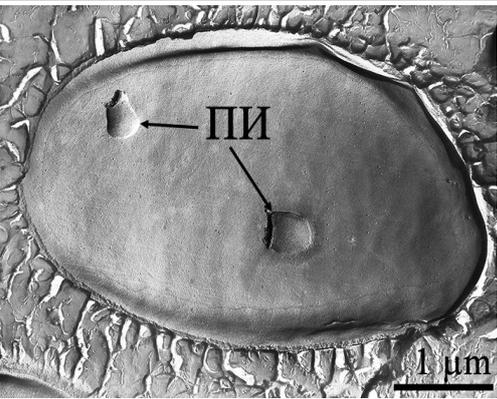
		Среда с глюкозой	Среда с ПАВ
	PF- поверхность	2337 ± 325	3906 + 312
	EF- поверхность	909 + 190	1188 + 468

Рис 3. Криофрактографический скол Плазмалеммы *C. humicolus* при культивировании на ПАВ (лаг – фаза роста). ПИ- петлевидные инвагинации

Список литературы:

1. Vladimir V. Dmitriev, David Crowley, Vadim V. Rogachevsky, Cristina Maria Negri, Tatiana G. Rusakova, Svetlana A. Kolesnikova, Lenar I. Akhmetov Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media. // FEMS Microbiol Lett 2011, 315, 134-140
2. Vladimir V. Dmitriev, David E. Crowley, Anton N. Zvonarev, Tatiana G. Rusakova, Maria C. Negri, Svetlana A. Kolesnikova Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. // Yeasts 2015 (DOI: 10.1002/yea.3140)
3. Vesicle transport gives insight into disease processes. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013.