

Федеральный исследовательский центр  
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

**VI Пушкинская школа-конференция  
«Биохимия, физиология и биосферная  
роль микроорганизмов»**

*2-6 декабря 2019*

**Материалы конференции**

Пушино – 2019

УДК 579.22

ББК 28.4

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издается  
в авторской редакции

VI Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: (сборник тезисов) - Москва: Издательство Вода: химия и экология, 2019. – 243 с.

ISBN 978-5-9909335-3-8

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

Конференция направлена на широкий обмен информацией в смежных областях микробиологических исследований – распространение микроорганизмов, включая обитателей слабоизученных экстремальных экосистем, их генетическое, биохимическое и структурно-функциональное разнообразие, новые биоаналитические методы, биотехнологические разработки. Изучение разнообразия микробного мира и принципов его взаимодействия с окружающей средой является реальным фундаментом генерации новых биологических знаний и создания принципиально новых технологий.

Работа конференции позволит расширить и укрепить научные связи между институтами и образовательными учреждениями, проводящими исследования в области фундаментальной и промышленной микробиологии.

УДК 579.22  
ББК 28.4

ISBN 978-5-9909335-3-8

© ФГБУН ФИЦ Пущинский научный центр  
биологических исследований РАН, 2019 г

# СОДЕРЖАНИЕ

Содержание.....	3
<b>Секция 1. Микробное разнообразие; экологическая роль микроорганизмов</b>	
Микробиом разновозрастных подзолов карьерно-отвалных комплексов Ленинградской области <i>Абакумов Е., Першина Е., Иванова Е., Кимеклис А., Гладков Г., Зверев А., Андронов Е., Поляков В., Кичко А.</i> .....	11
Микробиом природных и антропогенно-нарушенных почв национального парка Кат-тъен (Южный Вьетнам) <i>Абакумов Е., Зверев А., Андронов Е., Еськов А.</i> .....	12
Новые виды аэробных метилотрофных бактерий: <i>Methylobacillus methanolivorans</i> sp. nov. и <i>Methylobacillus caricis</i> sp. nov. <i>Агафонова Н. В., Капаруллина Е. Н., Доронина Н. В., Троценко Ю. А.</i> .....	13
Новая сульфатредуцирующая бактерия, перспективная для получения сульфидов металлов <i>Анциферов Д.В., Бухтиярова П.А.</i> .....	15
Поиск пробиотиков для аквакультуры дальневосточного трепанга <i>Apostichopus Japonicus</i> <i>Богатыренко Е.А., Дункай Т.И., Масленников С.И., Юнусова И.О., Ким А.В.</i> .....	16
Филогеномика грибов класса Leotiomycetes О.Е. Ericsson & Winka, основанная на ANI <i>Василенко О.В., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Малов В.О., Логачева М.Д., Озерская С.М.</i> .....	17
Влияние микромицетов на декоративность злакового газона в городских условиях <i>Жуков Ф.Ф., Калембет И.Н., Петровнина Т.А., Снурницина Я.Г., Поляков Д.Д.</i> .....	18
Глубинные микробные сообщества железовосстанавливающих бактерий в озере Байкал <i>Захарюк А.Г., Щербакова В.А.</i> .....	20
Мультирезистентные штаммы <i>Pseudomonas</i> spp., обнаруженные на детских площадках г. Пушкино <i>Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Дымова Е.А., Винникова К.С., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Кошелева И.А.</i> .....	22
Микробные сообщества воды и донных осадков субарктического меромиктического озера Светлое <i>Кадников В.В., Каллистова А.Ю., Русанов И.И., Кокрятская Н.М., Белецкий А.В., Марданов А.В., Саввичев А.С., Равин Н.В., Пименов Н.В.</i> .....	24
Идентификация и дискриминация бактерий рода <i>Bacillus</i> методом MALDI-TOF MS <i>Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И.</i> .....	25
Актиномицеты Монголии – антогонисты фитопатогенного гриба <i>Cladosporium fulvum</i> , поражающие овощные культуры <i>Норовсурэн Ж.</i> .....	27
Метаногенные археи в условиях космоса: эксперимент «ТЕСТ» на внешней поверхности МКС <i>Ошуркова В.И., Дешева Е.А., Щербакова В.А.</i> .....	29
Изменение микробного сообщества почв древних земледельческих угодий <i>Петросян А.А., Борисов А.В., Коробов Д.С.</i> .....	31
Новые бактериофаги Sam46 и Sam112, инфицирующие <i>Bacillus cereus sensu lato</i> <i>Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Загородный В.А., Шадрин А.М.</i> .....	32

Комплекс ассоциативных микромицетов липы крупнолистной ( <i>Tilia platyphyllos</i> Scop.) в условиях города <i>Полякова Н.Н., Бондарева Е.В., Иванова И.О., Котоврасов С.В., Голимбовская С.А.</i> .....	33
Характеристика микробиологического сообщества, изолированного с произведений темперной живописи 16-го века в Государственной Третьяковской галерее <i>Потапов М. П., Авданина Д. А., Климкина К. М., Федоров Д. Е., Веселовский В. А., Жгун А. А.</i> .....	35
Инструменты микробиологии единичных клеток: краткий обзор <i>Пучков Е.О.</i> .....	37
Разнообразии прокариотного сообщества, ассоциированного с миксомицетом <i>Lycogala epidendrum</i> <i>Сизов Л. Р., Лысак Л.В., Гмошинский В.И.</i> .....	39
Штаммы <i>Bacillus anthracis</i> , выделенные из вечной мерзлоты тундровой зоны России <i>Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А.</i> .....	40
Бактерии рода <i>Azospirillum</i> : новые местообитания и новые свойства. <i>Тихонова Е.Н., Хуснетдинова К.А., Кравченко И.К.</i> .....	42
Галофильный облигатный метилотроф <i>Methyloligella halotolerans</i> С2 экспрессирует три изоформы PQQ-зависимых метанолдегидрогеназ <i>Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Капарулина Е.Н.</i> .....	45
Разнообразии цианобактерий озера Хагийн Нуур (Монголия) <i>Цыренова Д.Д., Норовсурэн Ж.</i> .....	47
Новый вид аэробных метилотрофных бактерий рода <i>Starkeya</i> из активных илов <i>Чемодурова А.А., Капарулина Е.Н., Доронина Н.В.</i> .....	48
Бактериальная флора креветки <i>Neocaridina heteropoda</i> (Liang, 2002) <i>Шорохова А.П., Никулин Н.А., Присяжная Н.В., Зимин А. А.</i> .....	50
<b>Секция 2. Биохимия, физиология и молекулярная биология микроорганизмов</b>	
Генотипирование природных изолятов дрожжей <i>Saccharomyces</i> для селекции новых штаммов хересных дрожжей <i>Авданина Д. А., Ширяев М. И., Кишковская С. А., Танащук Т. Н., Шаламитский М. Ю., Эльдаров М. А., Равин Н. В., Марданов А. В.</i> .....	53
Геномная характеристика метилотрофа ' <i>Hansschlegelia quercus</i> ' Dub как фитосимбионта <i>Агафонова Н.В., Капарулина Е. Н., Доронина Н. В.</i> .....	55
Сравнительная характеристика полифосфатаз <i>Saccharomyces cerevisiae</i> из штаммов-суперпродуцентов <i>Андреева Н.А., Ледова ЛА., Рязанова Л.П., Томашевский А.А., Кулаковская Т.В., Эльдаров М.Э.</i> .....	57
Очистка и характеристика кислой фосфатазы Pho5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Андреева Н.А., Ледова ЛА., Рязанова Л.П., Кулаковская Т.В., Эльдаров М.Э.</i> .....	58
Ингибирование гемолитической активности экзотоксинов В. Cereus <i>Андреева-Ковалевская Ж.И., Чулин А.Н., Нагель А.С., Сиунов А.В., Солонин А.С.</i> .....	60
Биохимические свойства НАДФ <sup>+</sup> -зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы галоалкалофильного метанотрофа <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> 20Z <i>Андрянов П.А., Мустахимов И.И.</i> .....	61
Сравнительно-геномный анализ запрограммированного сдвига рамки считывания в гене <i>chlD</i> у прокариот <i>Антонов И.В.</i> .....	62

Аккумуляция кремния как ответ дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> на стрессовые воздействия <i>Аринбасарова А.Ю., Мачулин А.В., Бирюкова Е.Н., Сорокин В.В., Меденцев А.Г., Сузина Н.Е.</i> .....	64
Механизм токсического действия ауурофузарина – димерного нафтохинона гриба <i>Fusarium decemcellulare</i> <i>Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i> .....	67
Гетерологичная экспрессия тетрагеомового цитохрома <i>c</i> анаэробной бактерии <i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1 <i>Архинова О. В., Захарова М. В.</i> .....	69
Биологические особенности эпизоотически актуального для Российской Федерации вируса геморрагической болезни кроликов <i>Балашова Е.А., Сливко И.А., Живодеров С.П., Луницин А.В.</i> .....	71
О проблеме инвариантности межгеномной дистанции у прокариот <i>Василенко О.В., Георгиева З.Д.</i> .....	72
Определение оптимальных условий совместной экспрессии белков семейства «EF-руки» с N-концевыми ацетилтрансферазами <i>E.coli</i> <i>Воложжанникова А. А., Соколов А. С., Пермякова М. Е., Лантева Ю. С.</i> .....	75
Изучение ростовых характеристик штаммов рода <i>Delftia</i> , содержащих последовательность гена салицилат 5-гидроксилазы и нафталин-1,2-диоксигеназы <i>Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Соколов С.Л.</i> .....	77
Разработка подхода к исследованию свойств каспазы-3 методом детекции флуоресценции одиночных молекул <i>Грановский И.Э., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Соловьев И.Д., Гавшина А.В., Савицкий А.П.</i> .....	79
Метод электронно-микроскопического выявления гидролаз на дрожжевых экзоцеллюлярных компонентах <i>Дмитриев В. В., Звонарев А. Н., Русакова Т. Г.</i> .....	80
Активация серинового цикла у <i>Methyloviumicrobium alcaliphilum</i> 20Z при росте на метаноле <i>Егорова С. В., Бут С. Ю.</i> .....	82
Влияние АЦК-дезаминазной активности на конкурентоспособность эпифитного симбионта растений <i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 <i>Екимова Г.А., Агафонова Н.В.</i> .....	85
Генетическая идентификация сибиреязвенного штамма выделенного из нефтезагрязненного многолетнемерзлого грунта <i>Ерофеевская Л.А.</i> .....	86
Адгезия и биопленки нетуберкулезных микобактерий <i>Ерошенко Д.В., Попова И.В., Полюдова Т.В.</i> .....	89
Чувствительность к ципрофлоксацину бактерий <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 дикого типа и мутантов с делецией генов токсин-антитоксин системы <i>Ерошенко Д.В., Полюдова Т.В., Пьянкова А.В.</i> .....	91
Продукция вторичных метаболитов у мицелиальных грибов: роль полиаминов <i>Жгун А. А.</i> .....	93
Функциональная роль С-концевого домена гемолизина II <i>V.cereus</i> . <i>Замятина А.В., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С.</i> .....	95
Структурно-функциональные перестройки оболочки условно-патогенных дрожжей рода <i>Candida</i> при переходе в условия патогенеза	

<i>Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Фарофонова В.В., Мачулин А.В., Кулаковская Т.В., Дмитриев В.В.</i> .....	98
Эволюционный анализ структурных белков денсовирусов членистоногих <i>Зимин А. А., Назипова Н.Н., Дроздов А.Л.</i> .....	100
Филогения геномов бактериофагов, модифицирующих иммунную систему кур <i>Зимин А. А., Скобликов Н. Э., Назипова Н. Н., Василенко О. В.</i> .....	102
UPGMA - анализ последовательностей хвостовых шипиков фагов, родственных <i>Salmonella phage P22 (Lederbergvirus [P22-like viruses], Podoviridae)</i> <i>Зимин А. А., Назипова Н. Н.</i> .....	104
Филогеномика <i>Densovirinae</i> <i>Зимин А. А., Скобликов Н.Э.</i> .....	107
Океанические гомологи белка DenV фага T4 <i>Зимин А. А., Карманова А.Н.</i> .....	109
Новый конвергентный промотор As3 системы рестрикции-модификации II типа EcoRI играет ключевую роль в регуляции экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции <i>Казанцева О.А., Нагорных М.О., Захарова М.В.</i> .....	111
Пути метаболизма метанола и метиламина у нового грамположительного факультативного метилотрофа из рода <i>Rhodococcus</i> <i>Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Доронина Н.В.</i> .....	114
Метилотрофные фитосимбионты способны синтезировать полилизины <i>Капаруллина Е. Н., Присяжная Н.В., Доронина Н. В.</i> .....	115
Инкапсулирование вирулентных бактериофагов в полиэлектролитные микроконтейнеры, с последующим разрушением оболочки микрокапсул <i>Ким А.Л., Дубровский А.В., Мусин Е.В., Кудряшова Е.Б., Арискина Е.В., Тихоненко С.А.</i> .....	117
Лакказные изоформы гриба <i>Lentinus strigosus</i> 1566: потенциал для полимеризации фенолпропаноидов. <i>Коломыцева М.П., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Баскунов Б.П., Черных А.М.</i> .....	118
Микрометод для идентификации оксидаз с различным рН-оптимумом <i>Коломыцева М.П., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Черных А.М.</i> .....	119
Анализ генома нового изолята <i>Raenibacillus</i> sp. <i>Кольжецов Н.П., Глазунова О.А., Озолинь О.Н., Шавкунов К.С.</i> .....	120
Влияние мутации в гене бактериолитического фермента L15 на биогенез внешнемембранных везикул <i>Lysobacter</i> sp. XL1 <i>Кудрякова И.В., Афошин А.С., Ивашина Т.В., Сузина Н.Е., Серкова А.А., Васильева Н.В.</i> ....	122
Модулирование нуклеазной активности Flap-эндонуклеаз на примере РНКазы II бактериофага T4 <i>Кузницын Р.А., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.</i> .....	123
N-концевое ацетилирование рекомбинантных белков семейства «EF-руки» в условиях <i>in vivo</i> <i>Лаптева Ю. С., Пермякова М.Е., Соколов А. С.</i> .....	124
Структурно-функциональный анализ характеристик S1 доменов на примере исследования семейства рибосомных белков S1 <i>Мачулин А.В., Дерюшева Е.И., Галзитская О.В.</i> .....	125
Характеристика свойств фумараз А и С из облигатного метанотрофа <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> 20Z <i>Мельников О.И., Розова О.Н., Хмеленина В.Н.</i> .....	127

Оценка значения максимального выхода биомассы при росте клеток на нафталине как источнике вещества и энергии <i>Минкевич И.Г.</i> .....	128
Трансовариальная и трансфазовая передача боррелий из группы <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato европейским лесным клещем, <i>Ixodes ricinus</i> L., 1758 (Acari: Ixodidae) <i>Митева О. А., Григорьева Л. А., Мясников В.А., Гоголевский А.С.</i> .....	130
Клонирование и характеристика глюконаткиназы у нерастающих на сахарах метанотрофных бактерий <i>Мустахимов И.И., Решетников А.С., Бекен М.М., Екимова Г.А.</i> .....	132
Факторы, влияющие на гемолитическую активность гемолизина II <i>B. Cereus</i> <i>Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Колесников А.С., Сиунов А.В., Солонин А.С.</i> .....	134
Влияние органических и неорганических источников углерода на процесс биоокисления сульфидного концентрата <i>Нечаева А.В., Елкина Ю.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г.</i> .....	135
Отбор и идентификация бактериофагов подсемейства <i>Tevenvirinae</i> с неканоническими снованиями ДНК из природных источников <i>Никулин Н.А., Воложанцев Н.В., Кисличкина А.А., Шляпников М.Г., Зимин А.А.</i> .....	137
Устойчивость к ингибиторам ферментов путей биосинтеза путресцина у <i>Acremonium chrysogenum</i> ВКМ F4081D, высокоактивного продуцента антибиотика цефалоспориноса С <i>Нураева Г. К., Хомутов М. А., Авданина Д. А., Жгун А. А.</i> .....	140
Трегалопиридные биосурфактанты термотолерантного углеводородокисляющего штамма <i>Gordonia amicalis</i> 1D <i>Петриков К. В., Делеган Я. А.</i> .....	141
Регуляция генов деструкции нафталина происходит не только за счет участия специфического регулятора NahR <i>Позднякова-Филатова И.Ю., Петриков К.В., Ветрова А.А., Захарова М.В.</i> .....	144
Транскриптомный анализ как инструмент экотоксикологической оценки состояния гидробионтов <i>Прибыткова Е.В., Преминина О.С., Хмельницкая Д.В.</i> .....	144
Новые оксидазы аскомицетов <i>Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Коломыцева М.П.</i> .....	147
Адаптация <i>Desulfovibrio gilichinskyi</i> K3S <sup>T</sup> к отрицательной температуре и высокой солености <i>Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.</i> .....	148
Воздействие метаболитов <i>Raenibacillus peoriae</i> MBV-2 на раковые клетки предстательной железы линий LNCaP и PC3. <i>Рыццов Г.К., Абашина Т.Н., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Лауриновичус К.С., Земскова М.Ю., Вайнштейн М.Б.</i> .....	150
Влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост микроорганизма штамма <i>Rhodococcus</i> sp. X5 в среде с добавлением гексадекана, углеводорода нефти, и повышенной солёностью <i>Семёнова К.Р. Акатова Е.В.</i> .....	152
Обнаружение бактериоциноподобных веществ у ризосферных псевдомонад <i>Сиунова Т.В., Сизова О.И., Анохина Т.О., Кочетков В.В.</i> .....	154
Синтез и характеристика наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров <i>Смирнов И.В., Лисов А.В., Казаков А.С., Звонарев А.Н., Земскова М.Ю.</i> .....	156

Конструирование системы экспрессии для <i>in vivo</i> N-концевого ацетилирования рекомбинантных белков Соколов А. С., Лантева Ю. С. ....	158
Определение геномной последовательности штамма <i>Pseudomonas putida</i> AK5 Соколов С.Л., Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Ветрова А.А. ....	159
Оптимизация процесса получения экзополисахаридов при погруженном культивировании <i>Ganoderma lucidum</i> Тихомирова Т.С., Тараскевич М.Р. ....	160
Конститутивное снижение уровня полифосфатов в клетках <i>S. cerevisiae</i> приводит к мобилизации генов, ответственных за устойчивость к окислительному и марганцевому стрессу Трилисенко Л., Пенин А., Елисеева И., Кулаковский И., Валиахметов А., Звонарев А., Остроумов В., Кулаковская Т. ....	162
Геномный анализ метаболизма углеводов у бактерий рода <i>Sphaerochaeta</i> Трошина О.Ю., Щербакова В.А. ....	163
Медьсодержащие оксидазы бактерии <i>Streptomyces puniceus</i> : получение, характеристика ферментов Трубицин И.В., Трубицина Л.И., Лисов А.В., Ларионова А.П., Леонтьевский А.А. ....	165
Анализ генома метаногенной археи <i>Methanosarcina mazei</i> JL01 Трубицын В.Э., Ошуркова В.И., Щербакова В.А. ....	166
Выявление гетерогенности среди представителей рода <i>Debaryomyces</i> при помощи микоцинов <i>Wickerhamomyces anomalus</i> Фарофонова В.В., Качалкин А.В. ....	168
Получение и характеристика нокаут-мутантов <i>Methylorubrum extorquens</i> DM4 по генам предполагаемых L,D-транспептидаз METDI0480 и METDI3291 Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л. ....	170
Анализ взаимодействия транскрипционных факторов NahR – like типа с регуляторными областями Фролова А. А., Позднякова – Филатова И. Ю. ....	172
Влияние золя гидроксида марганца (II) на кинетику роста <i>Y. Enterocolitica</i> и <i>P. Aeruginosa</i> Черепанов Д.В., Леонова Л. В., Леонов В. В. ....	173
Новая диоксигеназа грамположительных бактерий, расщепляющая гентизат Черных А.М., Субботина Н.М., Шебанова А.Д., Моисеева О.В., Коломыцева М.П. ....	175
Особенности деградации малахитового зелёного оксидазами гриба <i>Thielavia ovispora</i> Шебанова А.Д., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Баскунов Б.П., Черных А.М., Коломыцева М.П. ....	176
Возможность усиления фунгицидного эффекта Фоликура® 250, КЭ против некоторых грибов рода <i>Fusarium</i> с помощью одного из вторичных метаболитов <i>Penicillium citrinum</i> Щербакова Л.А., Карташов М.И., Арсланова Л.Р., Джавахия В.Г. ....	178
Сравнительный геномный анализ коллекционных штаммов хересных дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Эльдаров М.А., Марданов А.В., Белецкий А.В., Думина М.В., Авданина Д.А., Танащук Т.Н., Кишковская С.А., Равин Н.В. ....	180
<b>Секция 3. Ресурсный биотехнологический потенциал микробного разнообразия</b>	
Литический потенциал везикул <i>Lysobacter capsici</i> ВКМ-2533 <sup>T</sup> Афошин А.С., Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Шушкова Т.В., Лисов А.В., Дудина Ю.И., Боровикова А.О., Леонтьевский А.А., Васильева Н.В. ....	183

Микробные композиции для биоконверсии отходов птицеводства и животноводства <i>Бабушкина О.А., Рафикова Г.Ф.</i> .....	184
Влияние биологических препаратов на рост сельскохозяйственных культур в одновидовых и смешанных посевах на ранних стадиях развития растений <i>Багманов Р.Т., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф.</i> .....	186
Киллер-токсин <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i> .....	188
Роль алкан гидроксилаз ALK В и CYP153 в процессе деструкции алканов штаммом <i>Gordonia</i> sp. 1D <i>Ветрова А.А., Делеган Я.А., Петриков К.В., Иванова А.А.</i> .....	190
Использование сверхмалых концентраций биологически активных веществ синергетического действия для интенсификации биотехнологических производств <i>Глухих С.А.</i> .....	191
Поиск грибов и бактерий, разлагающих промышленные полимерные материалы <i>Дубонос А.В., Красотина И.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i> .....	194
Бивыщелачивание медно-цинкового мышьяк-содержащего концентрата <i>Елкина Ю.А., Нечаева А.В., Меламуд В.С., Булаев А.Г.</i> .....	195
Конструирование флуоресцентных сенсоров, реплицируемых в <i>Pseudomonas</i> <i>Иванова Е.В., Фролова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю.</i> .....	197
Микробная сульфатредукция в отходах свиноклекса. <i>Карначук О.В., Панова И.А., Зюсман В., Кадырбаев М., Груздев Е.В., Кадников В.В., Пименов Н.В., Равин Н.В.</i> .....	198
Биоконверсия холестерина в прогестерон рекомбинантными штаммами <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 с делециями в генах окисления стероидного ядра <i>Карпов М.В., Стрижов Н.И., Шутов А.А., Донова М.В.</i> .....	200
Стабильность алкогольоксидазного биосенсора, модифицированного терморасширенным графитом <i>Китова А.Е., Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н.</i> .....	201
Новые активные грибные биокатализаторы трансформации андрост-4-ен-3,17-диона и андроста-1,4-диен-3,17-диона <i>Коллеров В.В., Шутов А.А., Казанцев А.В., Донова М.В.</i> .....	203
Характеристика микроорганизмов с фенолдеградирующими свойствами <i>Кувичкина Т.Н., Носулич В.Е., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Макаренко А.А., Решетилов А.Н.</i> .....	205
Новый метод выделения из мицелия <i>Mortierella alpina</i> смеси эфиров жирных кислот с высоким содержанием арахидоновой кислоты <i>Миронов А.А., Моргунов И.Г.</i> .....	206
Эффект изолимонной кислоты в модели обучения и памяти у крыс, подвергшихся нейротоксическому воздействию свинца и молибдена <i>Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Карпухина О.В., Бокиева С.В., Иноземцев А.Н.</i> .....	207
Биоэлектрохимические свойства проводящих матриц «фермент/полиэлектролиты/многостенные углеродные нанотрубки» <i>Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.</i> .....	209
Влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост бактерий-нефтедеструкторов <i>Rhodococcus</i> sp. S67 <i>Пронькина Ю.А., Акатова Е.В.</i> .....	212

Штаммоспецифичность биохимических и физиологических параметров утилизации глифосата у бактерий рода <i>Achromobacter</i> <i>Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А.</i> .....	214
Цито-физиологическая характеристика двух штаммов грамположительных ультрамикробактерий, выделенных с кожного покрова серой жабы <i>Bufo bufo</i> и оценка их биотехнологического потенциала <i>Сузина Н.Е., Абашина Т.Н., Полищева В.Н., Соболева О.И., Сорокин В.В., Звонарев А.Н., Мачулин А.В., Шорохова А.П., Дуда В.И.</i> .....	217
Долговременная генерация электроэнергии микробным топливным элементом <i>Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Решетилов А.Н.</i> .....	218
Участие инфузорий в мониторинге эвтрофированных водных объектов <i>Трибун М.М.</i> .....	220
Биотехнология и биологическая безопасность <i>Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б.</i> .....	223
Биоремедиация нефтезагрязненных почв республики Беларусь с использованием биопрепарата «Микробак» и сорбента на основе лигнина <i>Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Фунтикова Т.В., Алехин Р.С., Боронин А.М.</i> .....	225
Полногеномное секвенирование термофильного штамма <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i> ВКМ Ас-666 <sup>Т</sup> , перспективного для биотехнологии стероидов <i>Фокина В.В., Лобастова Т.Г., Брагин Е.Ю., Штратникова В.Ю., Стародумова И.П., Тарлачков С.В., Донова М.В.</i> .....	226
Исследование структуры микробного сообщества в фито-очистных сооружениях с различными технологическими схемами <i>Харитонов С.Л., Щеголькова Н.М., Рыбка К.Ю.</i> .....	229
Изменение популяции дрожжей ржаной хлебной закваски при длительном ведении <i>Хлесткин В.К.</i> .....	231
Микробиологическая характеристика ферментативной основы «Буза» как перспективного функционального напитка <i>Хусаинова А.Ф., Бикмурзина З.Р., Шакирова И.А., Фазылова Д.А.</i> .....	232
Антимикробная и фунгицидная активность 2-амино-тиазолов, содержащих дитерпеновый фрагмент <i>Хуснутдинова Н.С., Мещерякова С.А., Шумадалова А.В., Султанова Р.М.</i> .....	234
Влияние липопептидов <i>Bacillus subtilis</i> на компоненты про-антиоксидантной защитной системы растений пшеницы в норме и при инфицировании возбудителем септориоза" <i>Черепанова Е.А., Белобородова А.Н., Максимов И.В.</i> .....	236
Моделирование процесса биосинтеза лизина на крахмальной среде в лабораторных условиях на лабораторной установке Biostat A Plus <i>Шевченко А.Р., Пушкина А.В., Бovyкина Г.В., Холопов Н.С.</i> .....	238
Характеристика новых ферментов с фосфоноацетальдегид гидролазной активностью у бактерий-деструкторов глифосата рода <i>Achromobacter</i> <i>Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.</i> .....	241
Аусталиды V и W – новые меротерпеноиды из гриба <i>Aspergillus ustus</i> : структура и противоопухолевая активность <i>Антипова Т.В., Зайцев К.В., Опруненко Ю.Ф., Жеребкер А.Я., Рысцов Г.К., Земскова М.Ю., Желифонова В.П., Иванушкина Н.Е., Козловский</i> .....	244
Метаболизм и фитопатогенность сибирских штаммов грибов <i>Heterobasidion annosum sensu lato</i> <i>Желифонова В. П., Антипова Т. В., Литовка Ю. А., Павлов И. Н., Баскунов Б. П., Тимофеев А. А., Козловский А. Г.</i> .....	246

## Секция 1. Микробное разнообразие; экологическая роль микроорганизмов

### Микробиом разновозрастных подзолов карьерно-отвальных комплексов Ленинградской области

*Абакумов Е., Першина Е., Иванова Е., Кимеклис А., Гладков Г., Зверев А., Андронов Е., Поляков В., Кичко А.*

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург; e\_abakumov@mail.ru, e.abakumov@spbu.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_11-12

Хроносерию почв используют для оценки скоростей линейной эволюции почв и почвенных процессов в различных субстратно-фитоценологических комбинациях на территориях карьерно-отвальных комплексов. Разновозрастные почвы на одном типе почвообразующей породы могут быть информативными и для микробиологических исследований. В связи с этим проведены лабораторные метагеномные исследования проб почв хроносерию разновозрастных подзолов формирующихся на отвалах карьеров по добыче песчано-гравийных отложений. При сравнительном анализе эмбриопodzола, а также предклимаксовой и климаксовой стадии почв было установлено постепенное увеличение численности бактерий, грибов (преимущественно в верхних частях профиля) и архей (в минеральных горизонтах) в ходе развития почвообразовательного процесса. Число ОТЕ (операционных таксономических единиц, альфа-разнообразие) достоверно снижалось на поздних стадиях сукцессии. При анализе бета-разнообразия была проиллюстрирована эволюция микробиома, сопряженная с дифференциацией генетических горизонтов и почвенных профилей: на начальной стадии сукцессии микробиомы «зарождающихся» почвенных горизонтов имели сходную структуру, по мере развития почвы наблюдалось все более явная дифференциация микробиомов, соответствующих определенным генетическим горизонтам. Сообщества ранних стадий сукцессии имели более богатый таксономический состав, по сравнению с сообществами. В их состав входили филы, состоящие в основном из слабоохарактеризованных и, по большей части, некультивируемых бактерий: *Patescibacteria*, *Nitrospira*, *Gemmatimonadetes*, *Latescibacteria*, *Entotheonellaeota*; также здесь отмечалось сравнительное увеличение обилия архей группы *Thaumarchaeota* (до 11%). Для сообществ поздних стадий сукцессии характерно увеличение доли типичных почвенных фил - *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*. В ходе эволюции органогенного горизонта О отмечалась смена таксономического состава ацидобактерий, в эмбриональной почве доминировали в основном ацидобактерии из сем. *Vlactocatellaceae*, а также pp. *Subtercola* и *Arthrobacter*, в то время как в почвах более поздних стадий сукцессии бактерии pp. *Acidicapsa*, *Occalatibacter*, *Vryobacter* и *Candidatus Solibacter*, при этом в почвах климаксовой стадии разнообразие ацидобактерий увеличивалось на порядок. Происходила смена сообществ микроорганизмов-копиотрофов (*Pedobacter* (*Bacteroidetes*), *Candidatus Saccharibacteria* (*Patescibacteria*), *Comamonas*, *Variovorax* (*Proteobacteria*)) на сообщества микроорганизмов-олиготрофов (фил *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* (сем. *Cytophagales*), *Proteobacteria* (сем. *Acetobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Micropepsaceae*) и др.). Наряду с общим повышением уровня разнообразия увеличивалась доля почвенных бактерий, ассоциированных с корнями растений, а именно, бактерий из рода *Bradyrhizobium* и *Burkholderia*, а также сем. *Cytophagaceae*. Наиболее яркие изменения связаны с увеличением доли протеобактерий из группы WD260 в климаксовом сообществе.

Эволюция подзолистого (Е) горизонта во многом напоминала эволюцию органогенного горизонта, главным отличием было увеличение обилия и разнообразия ацидобактерий. Было проведено выделение ДНК и РНК в образцах трех разных генетических горизонтов (О, Е и ВС) эмбриопodzола. Анализ альфа-разнообразия не выявил значимых различий между образцами ДНК и РНК, однако анализ бета-разнообразия выявил существенные качественные и количественные различия в таксономическом составе микробиомов сравниваемых образцов. Таксономический анализ выявил присутствие суперфилы Patescibacteria и филы Thaumarchaeota только на уровне ДНК. Увеличение доли филы Proteobacteria во всех трех горизонтах происходит за счет увеличения разнообразия доминирующих групп бактерий – для горизонта О и Е это бактерии из группы PGPB (plant-growth promoting bacteria) – Bradyrhizobium и Comamonas, для горизонта ВС – бактерии из рода Stenotrophomonas. В горизонте ВС при анализе ДНК библиотек было обнаружено достаточно разнообразное микробное сообщество, состоящее из типичных почвенных бактерий – представителей фил Acidobacteria и Bacteroidetes, в то время как на уровне РНК эти данные не были подтверждены. Однако в данном горизонте выделялось два отчетливых пика численности цианобактерий Nostoc PCC-73102 и альфапротеобактерий р. Bradyrhizobium, присутствие которых может объясняться «заносом» этих групп микроорганизмов из вышележащих почвенных горизонтов. Таким образом, модель экогенетической эволюции подзолов от нулевой стадии до стадии климаксного подзола охарактеризована с помощью методов почвенной метагеномики впервые, что позволило выявить основные микробиологические драйверы начального почвообразования. Полученные данные в будущем могут быть использованы для разработки природоподобных технологий рекультивации техногенно-нарушенных земель.

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

## **Микробиом природных и антропогенно-нарушенных почв национального парка Кат-тьен (Южный Вьетнам)**

*<sup>1</sup>Абакумов Е., <sup>1</sup>Зверев А., <sup>1</sup>Андронов Е., <sup>2</sup>Еськов А.*

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

<sup>2</sup>Главный Ботанический Сад им Н.В. Цицина РАН, г. Москва;

e\_abakumov@mail.ru, e.abakumov@spbu.ru

Параметры биоразнообразия микроорганизмов для влажных тропических лесов остаются слабоизученными. В первую очередь это касается микробиома почв, который включает в себя до 95 % всего разнообразия микроорганизмов наземных экосистем. Применение методов высокопроизводительного метагеномного секвенирования позволяет выйти при изучении почвенного микробиома на новый методологический уровень и перейти к анализу больших массивов данных, а также к ревизии таксономического состава микробиоты. В связи с этим проведены исследования почв Национального парка Катъен, южная часть Вьетнама. Пробы отбирались из почв и почвоподобных образований нескольких экотопов: природных наземных почв, природных эпифитных почв и антропогенно-нарушенных почв (карьер, лесопосадки, точечные антропогенные нарушения). Выделение тотальной ДНК проводили из навески почвы массой 0.5 г при помощи набора реагентов FastDNA SPIN Kit for soil (“MP Biomedicals”) по методике производителя с модификацией на этапе гомогенизации. Гомогенизацию образца проводили на гомогенизаторе Precellus 24 в течение 30 с при 6500 об./мин. Оценку численности бактерий, архей и грибов в почве осуществляли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) их рибосомальных генов в амплификаторе iCycler

(Bio-Rad). Для приготовления библиотек гена 16S рРНК в каждой пробе ДНК проводили амплификацию с универсальными праймерами на вариабельный участок гена 16S рРНК V3–V4: F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) с добавлением служебных последовательностей по технологии “Illumina”. Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением. Обработку данных секвенирования осуществляли при помощи программного пакета QIIME. Изучены почвы в классическом понимании – черные слитые и красноземные, а также почвах в местах антропогенного нарушения (зарастающие карьеры и рекультивационные лесопосадки), а также подвешенные почвы, образующиеся в сообществах сосудистых эпифитов в кронах деревьев, характерные для тропических лесных экосистем. Количество рибосомальных генов микроорганизмов было максимальным в эпифитных почвенных образованиях и минимальным в антропогенно-нарушенных почвах. Наземные органо-минеральные почвы занимали промежуточное положение между указанными типами объектов. Аналогичные тенденции были характерны для величин индекса Шеннона. Установлено, что в целом, на уровне филумов, микробиологическое разнообразие всех типов почв сходно. Представители следующих филумов являются доминирующими: Proteobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes. В целом, представители данных филумов обычно являются доминирующими в тропических лесах. По параметрам биоразнообразия, между тем, исследованные объекты разделяются как минимум на три кластера: наземные органо-минеральные почвы, почвы антропогенно-нарушенных экосистем и подвешенные почвы. Связано, это, в первую очередь, с уровнями трофности сообществ. Так, наиболее обеспеченными азотом являются именно подвешенные почвы. Наиболее кислыми являются наземные почвы, что выражается в повышенном количестве ацидобактерий. В целом, полученные данные существенно дополняют сведения о микробиоме целинных минеральных почв данной территории (Chernov et al., 2019), а также о специфике эпифитного почвообразования во влажных тропических лесах Южного Вьетнама (Rodina et al., 2019).

*Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 17-16-01030 (метагеномное секвенирование) и РФФИ, грант № 18-04-00677 (экспедиционные исследования).*

#### Литература

1. Chernov, T.I., Zhelezova, A.D., Tkhakakhova, A.K., Bgazhba, N.A., Zverev, A.O. Microbiomes of Virgin Soils of Southern Vietnam Tropical Forests (2019) Microbiology (Russian Federation), 88 (4), pp. 489-498.
2. Rodina, O.A., Abakumov, E.V., Eskov, A.K., Prilepskiy, N.G. Humic substances formation as a result of biogenic-abiogenic interactions in epiphytic structures of the south vietnam tropical forest (2020) Lecture Notes in Earth System Sciences, pp. 417-434.

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

***Агафонова Н. В., Канаруллина Е. Н., Доронина Н. В., Троценко Ю. А.***

Пушкинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино,  
ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
nadyagafonova@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_13-15

Семейство *Methylophilaceae* относится к порядку *Methylophilales*, включает в себя три рода: *Methylophilus*, *Methylobacillus* и *Methylovorus*. В настоящее время род *Methylobacillus* представлен шестью видами аэробных, грамотрицательных облигатных и ограниченно факультативных метилотрофных бактерий: *M. glycogenes* ТК0113<sup>T</sup> (Yordy, Weaver, 1977; Urakami, Komagata, 1986), *M. flagellatus* КТ<sup>T</sup> (Говорухина с соавт., 1987), *M. pratensis* F31<sup>T</sup> (Doronina et al., 2004), *M. arboreus* Iva<sup>T</sup>, *M. gramineus* Lap<sup>T</sup> (Gogleva et al., 2011), *M. rhizosphaerae* Ca-68<sup>T</sup> (Madhaiyan et al., 2013). На среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии нами выделены облигатно-метилотрофные штаммы Z (из активного ила очистных сооружений Байкальского целлюлозно-бумажного комбината, Иркутская область) и OV (из корней осоки *Carex* sp., отобранных в окрестностях г. Пущино, Московская область).

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

Новые изоляты представлены грамотрицательными неспорообразующими подвижными палочками, размножаются бинарным делением. Штамм Z оптимально растет при температуре 29-35°C и pH 6.5-7.5, рост ингибируется 1% NaCl; для штамма OV оптимальная температура – 22-29°C, pH 7.5-8.5, рост ингибируется присутствием 3.5% NaCl в среде. При росте на среде с метанолом в жирнокислотном составе клеток штаммов Z и OV преобладают гексадекановая C<sub>16:0</sub> (44.5 и 45.5%, соответственно) и цис-9-гексадеценонная C<sub>16:1ω7c</sub> (44.2 и 40.7%, соответственно) кислоты, основной убихинон Q<sub>8</sub>. Доминирующие фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Энзимологический анализ показал, что оба штамма окисляют метанол классической метанолдегидрогеназой и реализуют рибулозомонофосфатный путь (РМФ) C<sub>1</sub>-метаболизма, о чем свидетельствуют активности ключевого фермента гексулозофосфатсинтазы, а также дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата. Штаммы реализуют КДФГА-вариант РМФ-пути C<sub>1</sub>-метаболизма, т.к. обнаружена активность 2-кето-3 дезокси-6-фосфоглюконатальдозазы.

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

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

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

Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма Z<sup>T</sup> депонированы в GenBank под номерами KX057479 и KX256483, соответственно. Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма OV депонированы в GenBank под номерами KY806199 и KY807769, соответственно. Типовые штаммы представлены в международных коллекциях микроорганизмов *Methylobacillus methanolivorans* Z<sup>T</sup> (= VKM В-3037<sup>T</sup> = JCM 31401<sup>T</sup> =

CCUG 68999<sup>T</sup>) и '*Methylobacillus caricis*' OV (= VKM B-3158 = JCM 32031 = CCUG 70601).

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

## **Новая сульфатредуцирующая бактерия, перспективная для получения сульфидов металлов**

*Анциферов Д.В., Бухтиярова П.А.*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск;  
dmitry.antsiferov@gmail.com

До недавнего времени сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) рассматривались, главным образом, с экобиотехнологической точки зрения [1]. В основном СРБ применяются в технологиях очистки сточных вод от загрязнений сульфатами и тяжелыми металлами. Однако, в последнее время стали появляться сообщения о влиянии этой группы микроорганизмов на образование минералов. Так в ряде работ было показано, что при культивировании СРБ, в присутствии металлов в питательной среде образуются различные формы минералов сульфидной природы, тогда как в контрольном опыте, с абиогенным сероводородом, такого эффекта не наблюдалось [2, 3]. Бактериальные клетки выступают в качестве центра нуклеации благодаря наличию полярных соединений на их поверхности [4], а также в качестве продуцентов высокореакционного сероводорода. Известно, что наноразмерные кристаллические сульфиды металлов широко применяются в разных областях промышленности [5].

Актуальность биотехнологического способа получения кристаллических сульфидов металлов заключается в дешевизне данного процесса, по сравнению с химическим синтезом. При этом тип кристаллизации может быть видоспецифичным, поэтому поиск новых представителей этой физиологической группы микроорганизмов также актуален.

Объектом исследования данной работы является новый штамм СРБ выделенный в сентябре 2019 года из малоизученного источника — термальная скважина на берегу реки Проходная (Казахстан, окрестности г. Алматы). Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК близкой к полной показал ближайшее сходство данного штамма с двумя представителями рода *Desulfovibrio*: *D. idahonensis* и *D. arcticus*, 97,3 % и 96,8% соответственно. Штамм был обозначен как *Desulfovibrio* sp. KZ1. Были исследованы некоторые его физиологические особенности. Данный штамм способен расти на пресноводной среде Видделя с лактатом при температуре 28°C и 37°C и при нейтральных значениях рН среды. Максимальная плотность клеток в культуральной жидкости составляет 10<sup>6</sup> кл/мл на вторые сутки культивирования, концентрация сероводорода на вторые сутки составляет 15,0 мг/л (± 0,5). На данный момент штамм способен к росту в присутствии ионов железа (II) в концентрации 25 мг/л. В культуральной жидкости наблюдается осадок черного цвета, предположительно сульфид железа, данное предположение необходимо проверить материаловедческими методами.

Так как штамм KZ1 обладает высокой скоростью роста и хорошей продуктивностью сероводорода, а также проявляет устойчивость к ионам железа (II), то в дальнейшем планируется изучить его способность образовывать кристаллические сульфиды железа.

*Исследования поддержаны грантом РФФИ №18-34-00535.*

## Литература

1. Muyzer G., Stams AJM. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 441-454.
2. Jencarova J., Luptakova A., Jandacka P. & Matysek D. (2014) The examination of biogenic and non-biogenic iron precipitates created by hydrogen sulphide. *Journal of the Polish Mineral Engineering Society* 34(2), 281-286.
3. Picard A., Gartman A., Clarke D.R., Girguis P.R. (2018) Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 220, 367-384.
4. Watson J.H.P., Cressey B.A., Roberts A.P., Ellwood D.C., Charnock J.M., Soper A.K. (2000) Structural and magnetic studies on heavy-metal-adsorbing iron sulphide nanoparticles produced by sulphate-reducing bacteria. *J MagnMagn Mat.* 214, 13-30.
5. Gaiardo A., Fabbri B., Guidi V., Bellutti P., Giberti A., Gherardi S., Vanzetti L., Malagù C., Zonta G. (2016) Metal Sulfides as Sensing Materials for Chemoresistive Gas Sensors. *Sensors.* 16, 296.

### **Поиск пробиотиков для аквакультуры дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus***

<sup>1</sup>Богатыренко Е.А. , <sup>1,2</sup>Дункай Т.И., <sup>2</sup>Масленников С.И., <sup>1</sup>Юнусова И.О., <sup>1</sup>Ким А.В.

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток,

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, г. Владивосток

Среди представителей класса голотурий *Holothuroidea* (тип Иглокожие – *Echinodermata*) немало коммерчески ценных видов животных, которые представляют большой интерес для аквакультуры. Одним из таких объектов является дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus*. По данным литературы, наиболее частыми причинами массовой гибели *Apostichopus japonicus* в условиях его искусственного воспроизводства являются заболевания, вызванные такими микроорганизмами, как *Vibrio splendidus* и *Vibrio alginolyticus*. Одним из наиболее перспективных способов решения этой проблемы является применение пищевых добавок на основе микроорганизмов-пробиотиков, которые способны избирательно ингибировать рост патогенных микроорганизмов, не нанося при этом вред организму хозяина. На сегодняшний день в литературе имеются ограниченные сведения о положительном влиянии отдельных видов бактерий, дрожжей и бактериофагов, полученных из различных источников, на воспроизводство *Apostichopus japonicus*. В связи с этим поиск пробиотиков для этого вида иглокожих остается по-прежнему актуальным.

Цель работы – поиск микроорганизмов с пробиотическим потенциалом и оценка их влияния на прирост массы дальневосточного трепанга в модельных экспериментах.

Для работы была использована ранее полученная нами коллекция штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из пищеварительной системы дальневосточного трепанга из естественной среды обитания. Изучение антагонистических свойств симбионтной микрофлоры трепанга проводили на патогенных штаммах вибрионов, выделенных из аквакультурных хозяйств. Межмикробные взаимодействия изучали методом перпендикулярных штрихов на универсальной агаризованной среде для морских микроорганизмов СММ. Для выявления у симбионтных микроорганизмов способности синтезировать ферменты, участвующие в пищеварении хозяина, все исследуемые штаммы бактерий были высеяны на чашки с агаризованными средами,

содержащими один из следующих субстратов: крахмал, хондроитинсульфат, хитин, альгинат натрия, твин 40, твин 80, оливковое масло, казеин и желатин. Для оценки биологической безопасности потенциальных микроорганизмов-пробиотиков была проведена работа по выявлению у них некоторых факторов патогенности (синтез гиалуронидазы, нейраминидазы, плазмокоагулазы, лецитиназы и гемолизина). Биологически безопасные и наиболее активные в отношении синтеза пищеварительных ферментов и подавления роста патогенной микробиоты бактерии были использованы в качестве пищевой добавки для дальневосточного трепанга. Эксперименты на взрослых особях трепанга проводили в течение недели, на молоди - в течение 4 недель.

Из 134 штаммов бактерий способность разлагать крахмал проявили 12%, твины 40 и 80 - по 16%, казеин и желатин - по 8%, альгинат и хондроитинсульфат - по 7%, хитин - 6% и оливковое масло - 10%. Из всех исследуемых штаммов бактерий различную степень антимикробной активности в отношении изучаемых тест-культур проявили 11 штаммов (8%). На основе полученных результатов для следующего этапа исследований, направленных на определение микроорганизмов, повышающих скорость роста дальневосточного трепанга были выбраны культуры без факторов патогенности: 5 штаммов с наибольшим противомикробным потенциалом и 2 штамма с высокой активностью пищеварительных гидролаз.

Кормление молоди и взрослых особей трепанга добавками на основе потенциальных пробиотиков в модельных экспериментах продемонстрировало значительный положительный эффект по сравнению с контролем. Для получения оптимальных результатов, которые будут целесообразно внедрять в аквакультуру, следует экспериментально подобрать необходимые концентрации отдельных культур или их сочетаний, а также, возможно, скорректировать схему кормления животных.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00693.*

## **Филогеномика грибов класса *Leotiomyces* O.E. Ericsson & Winka, основанная на ANI**

**<sup>1</sup>Василенко О.В., <sup>1</sup>Кочкина Г.А., <sup>1</sup>Иванушкина Н.Е., <sup>2</sup>Малов В.О., <sup>3</sup>Логачева М.Д., <sup>1</sup>Озерская С.М.**

<sup>1</sup>Отдел ВКМ ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, г. Пущино; DOI: 10.18334/ibpm2019\_17-18

<sup>2</sup>Факультет биотехнологии МГУ им. Ломоносова

<sup>3</sup>Лаборатория эволюционной геномики ФББ МГУ им. Ломоносова; ovvasilenko@gmail.com

Класс *Leotiomyces* — это один из крупнейших по известному биоразнообразию классов царства грибов. В нем имеются крупные таксономические группы, выработавшие стратегии выживания в экстремальных условиях. Ключом к пониманию путей их приобретения, а также систематической структуры является естественная и объективная модель эволюции - филогенетическое дерево. Наиболее надежными являются деревья, построенные на основе анализа большого объема нуклеотидных последовательностей, в идеале - всего генома. Дистантные деревья, основанные на попарном сравнении геномов, в отличие от других, требующих мультилокусного тотального выравнивания, менее требовательны к качеству геномных сборок, поэтому могут использовать наиболее репрезентативные выборки геномов. Мы вправе предложить свой вариант филогеномной модели класса *Leotiomyces*, так как для него уже имеется в открытом доступе более полутора сотен полногеномных сборок, более 20 из которых получено с нашим участием,

а также мы первыми в мире начали применять вычисление ANI для грибов в таксономических интересах.

Цель работы - построить на основе наиболее быстрого из корректно работающих алгоритмов - FastANI - дистантное филогеномное дерево класса *Leotiomycetes* и выявить характерные для таксонов различного ранга относительные межгеномные дистанции (ОМД). Мы первыми на деле совершаем попытки такого рода в микологии, хотя в бактериологии для таксонов видового ранга критерии существуют и обновляются (Chun et al., 2018). Необходимость использования для грибов и других эукариот в ближайшей перспективе подхода, основанного на ОМД, в 2018 году декларировали пока в виде планов на ближайшее будущее представители NCBI, США (Ciuffo et al., 2018). Мы использовали имеющиеся в базе GenBank полногеномные сборки, относящиеся к данному классу; а также секвенировали восемь новых на платформе Illumina, а три из них дополнительно и на Oxford Nanopore. ОМД вычисляли на основе т.н. показателя средней нуклеотидной идентичности (FastANI, Chirag et al. 2018).

Результаты исследования. Полученные данные позволяют оценить особенности внутривидовой дисперсии значений ОМД у грибов. Проведено также сравнение по критерию конгруэнтности деревьев, построенных по выравниванию геномного масштаба и по таблице ОМД, вычисленной при разных настройках FastANI-метода. Проблема "вырождения" ОМД при увеличении эволюционной дистанции существует и в качестве решения не может автоматически использовать подход, имеющийся для прокариот. В дальнейшем мы будем все вновь появляющиеся геномы присоединять к "нашему" дереву, актуализируя его. Более общие закономерности применения ANI для филогеномики грибов можно изучить, выйдя за пределы данного класса, на более существенной статистике, и это неизбежный будущий тренд, так как его планирует формировать GenBank (NCBI, США; Ciuffo et al., 2018).

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01347.*

## **Влияние микромицетов на декоративность злакового газона в городских условиях**

***Жуков Ф.Ф., Калембет И.Н., Петровнина Т.А., Снурницина Я.Г., Поляков Д.Д.***

ФГБНУ ВНИИ фитопатологии, Московская область, Большие Вяземы; zhukov.fedor@gmail.com

В условиях мегаполиса (западный административный округ г. Москвы) проведены обследования многолетних злаковых газонов по оценке их функциональности и декоративности с применением методов фитомониторинга [1]. В специализированной лаборатории на базе ФГБНУ ВНИИ фитопатологии в отделе патологии декоративных и садовых культур выполнены микробиологические исследования по оценке структурно-функционального разнообразия микромицетов в почве, отобранной с участков газонных трав, отличающихся декоративностью и состоянием травостоя. Выделение микромицетов проводили методом посева на питательную среду Чапека с антибиотиком [2]. Видовую принадлежность выделенных микромицетов устанавливали на основании культурально-морфологических признаков по современным определителям для соответствующих таксономических групп, структуру выделенных грибных комплексов характеризовали по показателю *частота встречаемости вида* (ЧВ в %). Терминология приведена в соответствии с Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

В результате визуальных обследований городского газона было установлено, что в отдельных локациях злакового газона формируются не благоприятные для роста растений

условия, приводящие к нарушениям в обменных процессах (фотосинтез), замедлению роста, формированию пятнистостей листьев, хлоротичной окраске, общему ослаблению устойчивости к поражению болезнями. На газоне отмечены пятна отличные по качеству и декоративности от всей площади. Визуально они представляют собой участки с травой отличной по цвету и качеству – пожелтение и побурение растений, почва в корневой зоне отличается переуплотненностью, в местах поражения газона наблюдали зарастание иными (сорными) растениями - одуванчик, подорожник, мятлик и др. Сорняки отмечены в большей степени на территории, с недостаточным поливом, где происходит замещение злакового газона на двудольные растения, более приспособленные к существованию в засушливых условиях.

В период эксплуатации на газонах отмечали плоскостную эрозию и локальные деформации газонной решетки (система модулей с ячеистой структурой), которые приводят к нарушениям в распределении влаги на газоне, снижая устойчивость травянистой растительности к поражению фитопатогенными грибами. В городских условиях на отдельных территориях используют искусственный полив. В этом случае можно наблюдать неравномерный пролив всей площади газона, что также изменяет условия роста газонных трав, а, следовательно, и способствует формированию микрозон «замокания», «иссушения», низкой аэрируемости, отличию по декоративности травостоя.

На основании визуальных симптомов на листовой поверхности отмечены грибные болезни, такие как ржавчина и пятнистости листьев. Но, особый интерес вызывает комплекс микромицетов в ризосферной зоне, т.к. наземную часть с болезнями листьев при проведении регулярных укосов удаляют.

В исследуемых образцах почвы с учетом локальных особенностей поражения злакового газона выделены следующие микромицеты:

- точка №1 (почва из зеленой части газона, возвышенность или верхний край, визуально здоровая) - *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. с ЧВ менее 10%, *F. oxysporum* Schltdl. (до 20%), *F. solani* (Mart.) Sacc. (60-83%), *Fusarium* sp. (до 10%), *F. graminearum* Schwabe (до 8%), *F. sporotrichioides* Sherb. (до 8%), *Pythium* sp. (до 8%);

- точка №2 (почва из зеленой части газона, средняя часть, визуально здоровая) – *Clonostachys* sp. с ЧВ до 100%, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (до 40%), *F. culmorum* (до 50%), *F. graminearum* (до 25%), *F. sambucinum* Fuckel (до 17%), *F. solani* (65-100%), *Fusarium* sp. (до 8%), *Pythium* sp. (до 30%), *Trichoderma* sp. (до 50%);

- точка №3 (почва из желтой части газона, средняя часть, пораженная растительность) - *Chaetomium* sp. с ЧВ равной 100%, *Clonostachys* sp. (8-100%), *F. solani* (33-50%), *Fusarium* sp. (до 100%), *Penicillium* sp. (до 18%), *Trichoderma* sp. (до 85%);

- точка №4 (почва из желтой части газона, понижение или нижний край, пораженная растительность) – *Clonostachys* sp. с ЧВ равной 17-33%, *F. culmorum* (до 20%), *F. oxysporum* (до 17%), *F. solani* (70-100%), *Fusarium* sp. (17-100%), *Pythium* sp. (до 100%).

В исследуемых образцах идентифицирован гриб *Phytium* sp., который вызывает корневую гниль, особенно в условиях повышенной влажности. Установлено, что ЧВ гриба *Phytium* sp. увеличивается от точки №1 (возвышенность, визуально здоровая растительность) до №4 (понижение, пораженная растительность), что отражает микролокальные неоднородности «злакового газона» и подтверждается изменениями по показателю рНвод от 6,7 до 7,2, соответственно, степенью увлажнения 40-70% ПВ (точка №1) и 60-90% ПВ (точка №4). Питиозная корневая гниль особенно вредоносна для растений на ранних стадиях их роста и развития, что наблюдается при обследовании отрастающего газона. Как правило, питиум встречается в комплексе с другими возбудителями корневых гнилей. Основные аспекты вредоносности патогена: первичное инфицирование здоровых тканей растений, создание условий для проникновения и

развития вторичной инфекции – возбудителей гельминтоспориоза, фузариоза, ризоктониоза и других, а также сапротрофов.

И действительно микромицеты рода *Fusarium* представлены большим разнообразием: *F. avenaceum* (ЧВ=40%), *F. culmorum* (ЧВ=10-50%), *F. graminearum* (ЧВ=8-25%), *F. oxysporum* (ЧВ=16-20%), *F. sambucinum* (ЧВ=16%), *F. solani* (ЧВ=33-100%), *F. sporotrichioides* (ЧВ=8%). Отметим, что при проведении уходных работ – стрижке газона, листья растений достаточно часто дополнительно ранятся (мочалются) плохо заточенным инструментом, что приводит к образованию «ран». *F. solani* является сапрофитным грибом, который может колонизировать мертвую органику или поражать ослабленное растение через поверхностные повреждения («раны»), вызывая корневые гнили.

В образцах из средней части газона (где исключено краевое влияние) зарегистрирован гриб-антагонист *Trichoderma* sp., который в большом количестве встречается в субстратах, богатых органическими остатками и окультуренных почвах.

Итак, грибной комплекс городских газонов отличается низким биоразнообразием. Ухудшение декоративности газонных трав (функциональные нарушения) связано с высокой частотой встречаемости гриба *Phytium* sp. (ЧВ=8-100%), который вызывает первичное инфицирование здоровых тканей растений, создавая условия для проникновения и развития вторичной инфекции (*Clonostachys* sp. (ЧВ=8-100%) и *Fusarium* sp. (ЧВ=10-100%)), которые колонизируют мертвую органику (например, газонный войлок), поражают ослабленное растение через поверхностные повреждения (стрижка плохо заточенным инструментом, наличие оставленных пораженных скошенных растений на газоне), вызывая пятнистости листьев, хлоротичную окраску, корневые гнили.

#### Литература

1. Серая Л.Г., Ларина Г.Е., Иванова И.О. Актуальность энтомо-фитопатологического мониторинга в условиях Московской агломерации /Сборник материалов XX Международного научно-практического форума "Проблемы озеленения крупных городов" Сборник материалов форума в рамках Международной выставки "Цветы - 2018". 2018. С.147-149.
2. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ. 1991. 304 с.

### **Глубинные микробные сообщества железовосстанавливающих бактерий в озере Байкал**

**Захарюк А.Г., Щербакова В.А.**

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

В настоящее время уже не вызывает сомнения тот факт, что железо является неотъемлемым физиологическим требованием для жизни, а для многих микроорганизмов его роль выходит далеко за рамки метаболической необходимости. Сделано много принципиально важных открытий, способствующих пониманию роли железовосстанавливающих бактерий (ЖВБ) в природных микробных сообществах. Тем не менее, большая часть результатов получена для мезофильных либо термофильных условий и в отсутствие какого-либо стресса. Вопрос о филогенетическом составе,

метаболических особенностях и механизмах формирования микробных железовосстанавливающих сообществ в низкотемпературных эконивах остается малоизученным и актуальным. Изучение донных осадков оз. Байкал, проводимые нами последние несколько лет, показали, что в данных экосистемах с постоянно низкой положительной температурой активно идет микробиологический процесс восстановления растворимых комплексов трехвалентного железа. Настоящая работа является продолжением этих исследований по изучению биоразнообразия анаэробных железовосстанавливающих сообществ, выделению чистых культур, определению их экофизиологических характеристик и роли в формировании устойчивых микробных сообществ.

В качестве объекта исследования была взята проба поверхностных донных отложений, отобранная в северной части оз. Байкал с глубины 409 м (4°C, pH 7.03). В результате длительной инкубации пробы в темноте при 5, 15 и 20°C с цитратом Fe(III), в качестве акцептора электронов, и формиатом, в качестве донора электронов, было получено несколько накопительных культур ЖВБ. Детальный анализ активностей накопительных культур показал, что сформировавшееся микробное сообщество одной накопительной культуры при 15°C способно к диссимиляционному восстановлению растворимых комплексов Fe(III), сопряженному с окислением формиата. Данная накопительная культура ЖВБ представляла для нас особый интерес и была выбрана для дальнейших экспериментов. На твердой среде в анаэробных условиях накопительная культура образовывала отдельные мелкие колонии черного цвета. В результате переноса отдельных колоний в жидкую среду того же состава, была получена чистая культура ЖВБ – штамм Bk11. Клетки штамма представлены Г(-) подвижными палочками. С лактатом в качестве донора электронов, штамм Bk11 восстанавливал аморфную гидроокись окисного железа (АГОЖ) и хинон (AQDS).

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма Bk11 выявил, что изолят принадлежит к роду *Pelosinus*. Его ближайшими родственниками являлись виды *P. fermentans* (99.17% сходства), *P. propionicus* (99.05% сходства) и *P. defluvii* (97.03% сходства). Род *Pelosinus* был описан в 2007 году для определения таксономического положения новой бактерии, принадлежащей к группе *Sporomusa–Pectinatus–Selenomonas* филума *Firmicutes*, семейства *Sporomusaceae* (Shelobolina et al., 2007). На сегодняшний день описано три вида рода *Pelosinus*, выделенных из различных природных и антропогенных мест, расположенных в разных странах (Мое et al., 2012). Все виды данного рода мезофильные спорообразующие анаэробы, способные восстанавливать растворимые комплексы Fe(III) при наличии в среде сбраживаемого субстрата. Как и другие ферментативные бактерии, они используют трехвалентное железо для стока электронов. Филогенетический анализ показал, что выделенный штамм Bk11 кластеризуется с двумя видами рода *Pelosinus*, образуют при этом отдельную ветвь (рис. 1).

Дальнейшее изучение выделенной нами чистой культуры ЖВБ позволит более полно сказать о ее физиологических особенностях и роли в железовосстанавливающем микробном сообществе низкотемпературных донных отложений пресноводных экосистем.

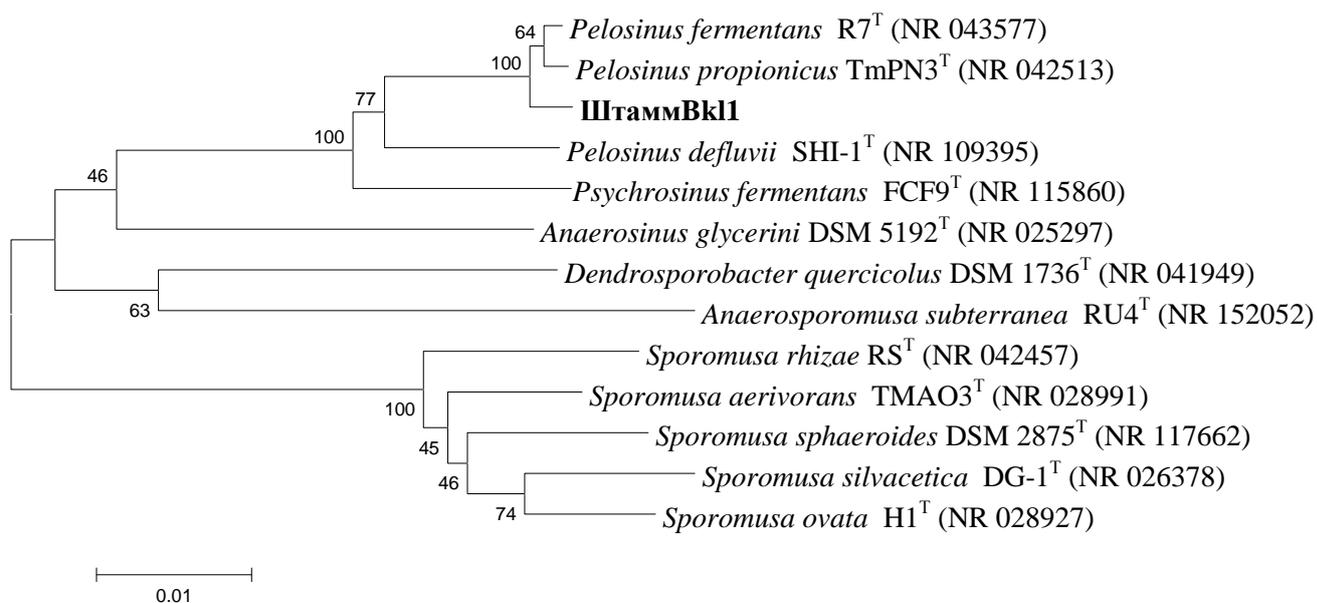


Рис. 1. Филогенетическое древо (метод Neighbor-Joining), построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма Bkl1 среди представителей семейства *Sporomusaceae*. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Данные “bootstrap”-анализа указаны в узлах ветвления.

#### Литература

1. Shelobolina E. S., Nevin K. P., Blakeney-Hayward J. D., Johnsen C. V., Plaia T. W., Krader P., Woodard T., Holmes D. E., VanPraagh C. G and D. R. Lovley. *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses // IJSEM. 2007. V. 57. P. 126 – 135.
2. Moe W. M., Stebbing R. E., Rao J. U., Bowman K. S, Nobre M. F., M. S. da Costa and Rainey F. A. *Pelosinus defluvii* sp. nov., isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater, emended description of the genus *Pelosinus* and transfer of *Sporotalea propionica* to *Pelosinus propionicus* comb. nov. // IJSEM. 2012. V. 62. P. 1369 – 1376.

### Мультирезистентные штаммы *Pseudomonas* spp., обнаруженные на детских площадках г. Пущино

<sup>1</sup>Измалкова Т.Ю., <sup>1</sup>Сазонова О.И., <sup>1,2</sup>Дымова Е.А., <sup>1,2</sup>Винникова К.С., <sup>1</sup>Гафаров А.Б.,  
<sup>1</sup>Соколов С.Л., <sup>1</sup>Кошелева И.А.

<sup>1</sup> ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
<sup>2</sup>ПушГЕНИ; tatiz@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_22-24

К настоящему времени накоплены многочисленные факты, свидетельствующие о том, что интенсивное использование антибиотиков неизбежно приводит к возникновению и распространению устойчивых к ним штаммов бактерий. За последние 20 лет мультирезистентные штаммы практически полностью вытеснили штаммы, устойчивые только к одному антибиотику. Возникновение патогенов с множественной лекарственной устойчивостью все чаще ставит под угрозу успешное лечение бактериальных инфекций и

является глобальной проблемой в области здравоохранения, решение которой требует эффективных действий. Особой опасности подвергаются дети, поскольку их иммунная система ещё до конца не сформирована. В 2001 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала глобальную стратегию по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. Устойчивость к антибиотикам возникла у почвенных бактерий как защитный механизм миллионы лет назад, поэтому распространение резистентных патогенных микроорганизмов в клинике не может рассматриваться отдельно от процессов циркуляции детерминант устойчивости к антибиотикам в природных эконисах. Именно неклиническим микроорганизмам принадлежит основная роль в поддержании и распространении генов антибиотикорезистентности в окружающей среде путем горизонтального переноса. Особый интерес представляют почвенные штаммы псевдомонад, поскольку, обладая сами по себе низкой вирулентностью, они могут эффективно передавать детерминанты резистентности таким опасным госпитальным патогенам, как *P. aeruginosa*. Общественные детские площадки - это место прямого контакта ребёнка с окружающей средой. Цель данной работы заключалась в выяснении вопроса: являются ли детские площадки с различным типом покрытия резервуаром антибиотикорезистентных микроорганизмов и какой тип покрытия наиболее безопасен.

В данной работе были исследованы 6 детских площадок города Пущино Московской области с различными типами покрытия: песок (площадка №1), грунт с песком (площадка №4), травяное покрытие (площадки № 2 и 6) и современное покрытие для детских площадок с прессованной резиновой крошкой (площадки №3 и 5). Для изоляции антибиотикорезистентных штаммов высевы производили на полноценную среду (L-agar), содержащую один из перечисленных антибиотиков в соответствующих концентрациях: цефтазидим (40 мкг/мл), цефепим (40 мкг/мл), меропенем (40 мкг/мл), эритромицин (100 мкг/мл), тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл). Микроорганизмы резистентные ко всем использованным индивидуальным антибиотикам были обнаружены в пробах со всех детских площадок, за исключением площадки №1, где отсутствовали устойчивые к тетрациклину бактерии. Кроме того, мультирезистентные штаммы, устойчивые к трём и более антибиотикам были изолированы со всех площадок.

По результатам исследования самым чистым типом покрытия, как по общей численности культивируемых микроорганизмов ( $8 \times 10^5$ /г субстрата), так и по содержанию резистентных штаммов, оказался песок площадки №1. Наиболее загрязнёнными по общей численности культивируемых микроорганизмов ( $1.2 - 1.9 \times 10^9$ /г субстрата) и по содержанию резистентных к антибиотикам штаммов, оказались площадки № 3 и № 5, покрытые прессованной резиновой крошкой. Вероятно, пористое резиновое покрытие служит иммобилизующим носителем для микроорганизмов и позволяет им формировать устойчивые к воздействию внешней среды биоплёнки.

Для дальнейшей работы были отобраны резистентные микроорганизмы, предположительно относящиеся к псевдомонадам флуоресцирующей группы, что было предварительно подтверждено путём посева на PIA (*pseudomonas isolation agar*) и на среду KingB. С использованием системы MALDI Biotyper из шестидесяти шести штаммов флуоресцирующих псевдомонад 51 идентифицированы как *P. fluorescens*, 10 – как *P. putida* и пять – как *Pseudomonas* sp. Методом REP-PCR с использованием праймера BOXA1R среди исследуемых штаммов по степени сходства были выделены 33 группы геномных фингерпринтов. Несмотря на то, что детские площадки города Пущино расположены на небольшом расстоянии друг от друга, обитающие на разных площадках штаммы псевдомонад флуоресцирующей группы оказались не родственны друг другу.

Поскольку в настоящее время тетрациклин является одним из наиболее широко применяемых антибиотиков в здравоохранении, сельском хозяйстве и животноводстве, а резистентные к тетрациклину бактерии распространены повсеместно, 14 устойчивых к тетрациклину штаммов псевдомонад тестировали на наличие *tet*-генов, отвечающих за различные механизмы резистентности. У 12 штаммов обнаружены гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки, у штаммов *P.fluorescens* D3A-28 и D4A-46 механизм устойчивости к тетрациклину определить не удалось.

Гены антибиотикорезистентности обычно ассоциированы с мобильными генетическими элементами: плазмидами, транспозонами и интегронами. Коллекцию тестировали методом ПЦР на наличие плазмид следующих групп несовместимости: IncP-1, IncP-7, IncP-9 и IncQ. В штаммах *Pseudomonas* sp. D3T-36 и *P.fluorescens* D4A-46 были обнаружены большие (более 100 т.п.н.) конъюгативные плазмиды устойчивости к тетрациклину P-1 и P-7 групп несовместимости, соответственно.

Если плазмиды группы несовместимости P-1 считаются одним из основных носителей генов резистентности, то ранее была известна только одна IncP-7 плазида Rms148, несущая детерминанты устойчивости к стрептомицину. Плазмид устойчивости к тетрациклину, принадлежащих к P-7 группе несовместимости, до настоящего времени обнаружено не было.

## **Микробные сообщества воды и донных осадков субарктического меромиктического озера Светлое**

***Кадников В.В., Каллистова А.Ю., Русанов И.И., Кокрятская Н.М., Белецкий А.В., Марданов А.В., Саввичев А.С., Равин Н.В., Пименов Н.В.***

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва; vkadnikov@biengi.ac.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_24-25

Бореальные пресные водоемы, расположенные к северу от 50° с.ш., считаются важным источником парникового газа метана. Среди них доминирующими типами водоемов являются ледниковые, послеледниковые и термокарстовые озера. Разнообразие микробных сообществ, участвующих в процессах цикла метана в этих озерах, плохо изучено, особенно для пресноводных меромиктических озер с постоянно анаэробным гипоплимнионом. Биогенный метан вырабатывается главным образом метаногенными археями. В большинстве пресноводных меромиктических озер с низким содержанием сульфата активные процессы метаногенеза начинаются уже монимолимнионе и достигают максимальных интенсивностей на границе раздела вода-осадок. В условиях отсутствия конкуренции с сульфатредукторами ацетат и другие низкомолекулярные продукты разложения ОР становятся доступными для метаногенов, которые в таких водоемах играют роль основных терминальных деструкторов ОР.

Мы исследовали микробные сообщества воды и донных осадков субарктического озера Светлое (Архангельская область), относящегося к редкому типу пресноводных меромиктических озер с высокими концентрациями Fe(II) и метана в постоянно анаэробном гипоплимнионе. В результате молекулярного анализа последовательностей генов 16S рРНК были охарактеризованы микробные сообщества воды на разных глубинах, - 0.5, 5, 10, 17, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 27, 33 и 38 м. Полученные данные по составам микробных сообществ выявили их отличия в верхней аэробной зоне (0.5-17 м), хемоклине (21-24 м) и нижней анаэробной зоне (27-38 м). Микробные сообщества верхней аэробной зоны характерны для водоемов с насыщенной кислородом водой. В них преобладают Actinobacteria (27-32% в разных горизонтах), Bacteroidetes (30-36%), Planctomycetes (2-3%), Alphaproteobacteria (2-4%), Betaproteobacteria (7-20%) и

Verrucomicrobia (2-6%). Цианобактерии составляют значительную долю сообщества лишь на глубине 17 м (12%), а в верхних слоях их доля не превышает 3%. По-видимому, основными фотосинтетиками в верхних слоях воды являются микроводоросли, последовательности рРНК хлоропластов которых были нами детектированы. Доли цианобактерий и гамма-протеобактерий в микробных сообществах достигают максимума в верхней части зоны хемоклина, составляя на глубинах 21-21.5 м соответственно, 15-17% и 11-12% всех микроорганизмов. Гамма-протеобактерии в этом горизонте представлены почти исключительно метанотрофами рода *Methylobacter*. Вне зоны хемоклина доли этих групп в сообществах существенно ниже. Эти данные указывают на то, что в зоне хемоклина активный процесс окисления метана в условиях отсутствия или крайне низких концентраций кислорода, может обеспечиваться совместным действием цианобактерий, образующих кислород в результате фотосинтеза, и аэробных метанотрофов, использующих его для окисления метана. В нижнем горизонте хемоклина (глубина 22-23 м) содержание цианобактерий и гамма-протеобактерий в сообществах снижается, но увеличивается доля дельта-протеобактерий (до 6.5%), представленных сульфатредукторами порядка Desulfobacteraceae и Syntrophaceae (род *Desulfomonile*). Микробные сообщества анаэробной зоны, расположенной ниже хемоклина (горизонты 27-38 м) отличаются преобладанием архей, доля которых составляет 62-65%. Среди архей доминировали две группы, - Euryarchaeota (25-36% всех микроорганизмов) и Rasearchaeota (22-32%). Euryarchaeota были представлены метаногенами порядков Methanomicrobiales и Methanosarcinales в примерно равных соотношениях. Вторая группа, Rasearchaeota, до настоящего времени является «некультивируемой», эти археи имеют небольшие геномы и, вероятно, являются симбиотическими или паразитическими организмами. Также мы исследовали микробные сообщества донных осадков озера Светлое на глубинах до 62 см. В осадках доля архей на разных глубинах составляла 50-70% всего микробного сообщества. Около 30-50% всех микроорганизмов относились к некультивируемым линиям архей. Так, в поверхностных горизонтах доминировали Izemarchaea (10-11%) и Woearchaeota (7-14%). С глубиной увеличивалось содержание Bathyarchaeota, от 8% на границе воды и осадка до 27% на глубине 62 см. Из культивируемых групп архей были обнаружены гидрогенотрофные метаногены порядка Methanomicrobiales, доля которых с глубиной уменьшалась. Также в верхнем слое осадка присутствовали ацетокластические метаногены порядка Methanosarcinales, а метилотрофные метаногены Methanomassiliicoccales доминировали в средних слоях осадка (15-35 см). Среди бактерий наибольшую по численности группу составляли Chloroflexi, доля которых с глубиной увеличивалась до 28%. Среди других филумов бактерий были обнаружены Bacteroidetes, Planctomycetes, Atribacteria и Deltaproteobacteria. Таким образом, состав микробных сообществ глубинных горизонтов воды и донных осадков озера Светлое указывает на активный процесс метаногенеза. Значительную долю микробных сообществ составляли различные «некультивируемые» линии микроорганизмов с неизвестным метаболизмом.

*Работа поддержана грантами РФФ (16-14-10201) и РФФИ (18-34-20080).*

## **Идентификация и дискриминация бактерий рода *Bacillus* методом MALDI-TOF MS**

*Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И.*

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь;  
jugask@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_25-27

Общность филогенетического происхождения представителей рода *Bacillus*, значительная идентичность генома и некоторых фенотипических признаков доказывает необходимость проведения углубленных исследований различных аспектов биологических особенностей не только возбудителя сибирской язвы – *Bacillus anthracis*, но и других представителей рода *Bacillus* (1).

Основной средой обитания бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus*, является почва. Почва - уникальная среда обитания микроорганизмов, она чрезвычайно гетерогенная по структуре и имеет микро мозаичное строение. Чтобы правильно оценить роль почвы в экологии и эволюции бактерий следует понимать, что данный субстрат представляет собой совокупность множества очень мелких агрегатов, пронизанных порами, омываемыми почвенным раствором, протекающим по капиллярам. Остатки растений и животных, гумусовые вещества, распределены в ней неравномерно, а сосредоточены в отдельных микроочагах, где протекает бурная, но непродолжительная деятельность микробных сообществ, заселяющих эти участки (2).

Нами были охарактеризованы почвы Ставропольского края и близлежащих территорий юга России с точки зрения видового разнообразия обитающих в них представителей рода *Bacillus*. Тип почв определялся в соответствии атласом почв РФ Ставропольского края (3). В местах забора образцов для анализа снимались координаты для последующей их привязки к карте. Образцы отбирались с глубины 10-15 см, поверхность почвы очищалась от растений, их гнилых остатков и прочего мусора. Забор образцов почвы осуществлялся в наиболее перспективных местах: скотогонных трассах, склонов гор, лугов, в местах с высоким содержанием органических веществ. Для сравнения брались образцы с глинистых почв, солончаков, прибрежного ила.

Из полученных проб почвы делались водные суспензии, измерялся pH полученного раствора, эти суспензии высевались на HiCrome™ *Bacillus* Agar (HIMEDIA) методом посева на 3 чашки. HiCrome™ *Bacillus* Agar является дифференцирующей средой для бактерий рода *Bacillus*, на основе ферментации среды, цвета колоний, их морфологии далее осуществляли посев колоний вновь на HiCrome™ *Bacillus* Agar для получения чистой культуры из отобранных колоний. Данная дифференциальная среда прежде всего, позволяет визуально разделить культуры для последующего посева. Полученная чистая культура пересеивалась на LB-агар для дальнейшей характеристики культуры бактериологическими и молекулярными методами.

В ходе работы было проанализировано 86 образцов почв, отобранных с территории Ставропольского края и в сопредельных областях юга России. Было идентифицировано более 400 культур, из них 337 принадлежат к 26 видам рода *Bacillus*.

Табл. 1: Список идентифицированных бактерий рода *Bacillus*.

Идентификация		Количество выделенных культур	Идентификация		Количество выделенных культур
№:	Бациллы:		№:	Бациллы:	
1.	<i>Bacillus antrophaeus</i>	4	14.	<i>Bacillus siamensis</i>	8
2.	<i>Bacillus asahii</i>	1	15.	<i>Bacillus simplex</i>	12
3.	<i>Bacillus badius</i>	1	16.	<i>Bacillus sonorensis</i>	3
4.	<i>Bacillus cereus</i>	73	17.	<i>Bacillus cereus</i> sp.	43
5.	<i>Bacillus firmus</i>	2	18.	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	1
6.	<i>Bacillus halotolerans</i>	22	19.	<i>Bacillus subtilis</i>	10
7.	<i>Bacillus horneckiae</i>	1	20.	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	4
8.	<i>Bacillus idriensis</i>	1	21.	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1

9.	<i>Bacillus licheniformis</i>	31	22.	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	2
10.	<i>Bacillus marisflavi</i>	2	23.	<i>Lysinobacillus boronitolerans</i>	5
11.	<i>Bacillus megaterium</i>	31	24.	<i>Lysinobacillus fusiformis</i>	4
12.	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	20	25.	<i>Lysinobacillus sphaericus</i>	1
13.	<i>Bacillus pumilis</i>	52	26.	<i>Viridibacillus neidei</i>	2

Основным методом идентификации культур была MALDI TOF масс-спектрометрия на базе прибора Microflex LRF Bruker, в программной среде Biotyper RTC (v.3.1). Это быстрый и чувствительный метод, позволяющий не только идентифицировать неизвестную культуру, но и дискриминировать ее от близкородственных видов, что является неоспоримым преимуществом метода MALDI TOF (3). Пробы готовили лизисом 18 ч. вегетативной культуры в 80% ТФУ с последующей ультрамикроцентрифужной фильтрацией. Сбор спектров осуществлялся в автоматическом режиме, со стандартными параметрами настройки прибора, калибровка с помощью BTS стандарта (Bruker Test Standard). Для идентификации использовалась коммерческая база данных компании Bruker (версия Bruker Taxonomy V 7.0.0.0\_6903-7311) и лабораторная in-house MSP библиотека масс-спектров штаммов представителей рода *Bacillus*. Обработка и отбор спектров для последующего пополнения MSP in-house библиотеки новыми видами бацилл или увеличения уже существующей выборки, осуществлялась в программной среде FlexAnalysis (v. 3.3) и Biotyper (v. 3.1).

Сохранение выделенных культур позволит использовать их при тестировании на специфичность тест-систем и препаратов для диагностики сибирской язвы, а также оценить устойчивость (однородность) фенотипических свойств внутри видовых групп бацилл. Все полученные данные, включая фотографические материалы будут оформлены в виде электронной базы и могут быть использованы при видовой идентификации представителей рода *Bacillus*.

#### Литература

1. Okinaka R., Pearson T., Keim P. Anthrax, bat not *Bacillus anthracis*? // PLoS Pathog. – 2006. – 2(11): e112.
2. Мусаев Ф.А., Захарова О.А. Бактериальные сообщества в почве сельскохозяйственного назначения: Монография. – Рязань: РГАТУ, 2014. – 205с.
3. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:791. Published 2015 Aug 5. doi:10.3389/fmicb.2015.00791

### **Актиномицеты Монголии – антогонисты фитопатогенного гриба *Cladosporium fulvum*, поражающие овощные культуры**

**Норовсурэн Ж.**

Институт Биологии АН Монголии; norvo@mail.ru

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) относится к растениям, которые сравнительно поздно вошли в культуру в основной рацион питания человека в отличие от других овощных культур (лука, чеснока, огурца). Еще течение нескольких столетий во многих

странах его плоды считались несъедобными, растения выращивались как декоративные или лекарственные (Жученко., 1974).

Томат по данным РАО (Food and Agriculture Organization of United Nations), занимает первое место мире среди овощных культур (4 млн га), том числе защищенном грунте (60 % всей площади) (Поликсенова, 2008). Возбудитель бурой пятнистости листьев (Кладиспориоза) *Cladosporium fulvum* Cooke Гриб *C.fu Zvum* был впервые описан Cooke 1883 г. Из Южной Америки он попал в Европу и в настоящее время распространен повсеместно (Садыкина, 1985).

В Монголии распространение кладиспориоза - болезни томата, вызванной грибами вида *Cladosporium fulvum* составило 1.1-1.2% (Дондов и др., 2015). По полученным нами ранним данным, выделенные из разных субстратов штаммы стрептомицетов, подавляют рост фитопатогена-возбудителя болезни томата *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (Норовсурэн, 2006).

Цель нашей работы - поиск актиномицетов, синтезирующих биологически активные вещества с антагонистической активностью против фитопатогенного гриба *C. fulvum*, возбудителя кладиспориоза, поражающего томаты.

В работе использовали образцы дерново-таёжной почвы из лиственничного леса Тосонцэнгэл сомона Завханского аймака. Почвенные образцы отбирали из верхнего горизонта почв. Для выделения и дифференцированного учёта общей численности актиномицетов использовали традиционный метод поверхностного посева на среде НВА (Науакэва М., Нопомура Н., 1984). Посевы инкубировали в течение 28 дней при 28°C. Идентификацию выделенных штаммов проводили согласно определителю (Берджи, 1997); используя морфологические показатели, а также хемотаксономические признаки: присутствие в гидролизатах целых клеток LL- или мезо- ДАПК (диаминопимелиновые кислоты) и диагностических сахаров в гидролизатах целых клеток (Hasegawa T et al., 1983). Антагонистические свойства актиномицетов определяли методом блока, измеряли диаметр (мм) зоны отсутствия роста фитопатогена-возбудителя болезни томата *C. fulvum*. Данный фитопатогенный грибок был получен из коллекции микроорганизмов Института Защиты растений Монголии.

Для исследования было отобрано 37 штаммов актиномицетов, выделенных из почв лиственничных лесов. Из всех отобранных для исследования актиномицетов 5 штаммов *Streptomyces* sp показали антагонистическую активность против фитопатогенного гриба *Cladosporium fulvum*. Диаметр зон ингибирования варьировался от 8 до 30 мм.

Таким образом, показано, что актиномицеты, выделенные из лесных почв Монголии, способны подавлять развитие фитопатогенного гриба, возбудителя кладиспориоза томатов, и могут быть использованы в практике, для создания экологически безопасных биопрепаратов для защиты растений.

*Благодарность:* Автор выражает благодарность М. Гантуяа (Ms.D) - сотруднику Института Защиты растений Монголии, выделившему фитопатогенный штамм *C. fulvum* из томатов и предоставившему данный фитопатоген для исследований.

*Работа выполнена при поддержке гранта АНМонголии 2018/10.*

## Литература

1. Дондов Б., Уранчимэг А., Энхтувшин Х., Батчимэг Т., Нямсурэн Н. Текущий уровень и перспективы изучения болезней растений. Сб м/у конф: Текущие и будущие тенденции защиты растений. УБ 2015. С. 13-23.
2. Жученко, А. А. Дикie виды и полукультурные разновидности томатов и использование их в селекции / А. А. Жученко [и др.]. Кишинев, 1974. 139 с.
3. Норовсурэн Ж. Актиномицеты – антагонисты против фитопатогенных грибов и

- бактерий. в сб: «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных системах». М.: МАКС Пресс. 2006. С. 92.
4. Определитель бактерий Берджи\ Под ред. Дж. Хоулта, М. Крига, П. Смита, Дж. Стейли и С. Уилльямса. М. Мир, 1997. 799с.
  5. Поликсенова, В. Д. Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений/В. д. Поликсенова. -Минск: БГУ,2008.-159 с.: ил. -ISBN 978-985-485-840-1.
  6. Садыкина, Е.И. Особенности селекции тепличного томата на устойчивость к кладоспориозу. Дисс. канд. с.-х. наук. Тирасполь, 1985. 205 с.
  7. Hasegawa T., Takizawa M., Takida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. //J. Gen. Appl. Microbiol. 1983. V. 29. P. 319 -322.
  8. Hayakawa M., Nonomura H. HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. //Abstracts of papers presented at the annual meeting of the Actinomycetologists. Osaka. Japan. 1984. P.6.

## Метаногенные археи в условиях космоса: эксперимент «ТЕСТ» на внешней поверхности МКС

<sup>1</sup>Ошуркова В.И., <sup>2</sup>Дешевая Е.А., <sup>1</sup>Щербакова В.А.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
<sup>2</sup>Институт медико-биологических проблем РАН (ИМБП);  
oshurkova.viktoriya@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_29-31

Первый этап космической программы «ТЕСТ» (2011-2013 гг.) был направлен на исследование экологического состояния космических объектов и определение предпосылок и возможных механизмов возникновения и развития деструктивных процессов на поверхности Международной космической станции (МКС) и исследование космической пыли, оседающей на МКС [1]. Результатом этих исследований стало, в том числе, обнаружение некультивируемых групп архей в составе биозоля, собранного на внешней поверхности МКС специально разработанными для этой цели пробоотборниками в составе прибора «Тест».

Метаногены - это анаэробные хемолитотрофные археи, способные усваивать углекислый газ и другие неорганические соединения для образования метана, и которые могут существовать при дефиците органических соединений, отсутствии свободного кислорода и крайне низком количестве незамерзшей воды. Отдельные штаммы могут выдерживать низкое давление и высушивание [2], а также низкие температуры [3]. Благодаря таким свойствам, метаногенов можно рассматривать в качестве уникальных модельных микроорганизмов для изучения влияния космических условий (отсутствие кислорода, УФ-излучение и вакуум), что открывает новые возможности для поиска углеродной жизни во Вселенной.

Наши исследования были направлены на выбор метаногенного кандидата для участия во втором этапе эксперимента «ТЕСТ», направленного на изучение возможности сохранения микроорганизмов, помещенных на поверхность МКС и экспозиции в течение длительного времени (12 месяцев). Для подготовки к этому эксперименту нами было изучено влияние УФ-облучения и вакуумирования, как факторов космического пространства, на жизнеспособность метаногенов.

В качестве объектов исследования были использованы *Methanobacterium veterum* МК4<sup>T</sup> VKM В-2440<sup>T</sup>, *M. articum* М2<sup>T</sup> VKM В-2372<sup>T</sup>, *M. bryantii* М.о.Н<sup>T</sup> VKM В-1629<sup>T</sup>, *Methanosarcina mazei* S6<sup>T</sup> VKM В-1636<sup>T</sup> и *Methanosarcina* sp. JL01 VKM В-2370. Эксперименты по воздействию УФ излучения проводились в ИМБП РАН, а по влиянию

вакуумирования - в НПО им. С.А. Лавочкина. В тестировании участвовали три автотрофных штамма (МК4<sup>T</sup>, М2<sup>T</sup> и М.о.Н<sup>T</sup>), относящихся к роду *Methanobacterium*. Другие два штамма представляли род *Methanosarcina*, который обладает самой широкой субстратной специфичностью среди метанобразующих архей. Часть штаммов была выделена из многолетнемерзлых пород Арктики и адаптирована к перепаду температур – от отрицательных до положительных.

Облучение высокими дозами УФ (суммарная доза 6.06 кДж/см<sup>2</sup>) привело к полной гибели клеток штаммов *M. veterum* МК4<sup>T</sup>, *M. articum* М2<sup>T</sup>, *M. bryantii* М.о.Н<sup>T</sup> и *M. mazei* S-6<sup>T</sup>. Однако, в отличие от перечисленных микроорганизмов, штамм *M. mazei* JL01 через 10 дней начал продуцировать метан до контрольных значений. При облучении дозами УФ, моделирующих условия космоса, штаммы, относящиеся к роду *Methanosarcina*, хорошо перенесли условия эксперимента, и их численность не снизилась ниже 86% от первоначальной, а в случае *M. mazei* S-6 облучение мощностью 166.4 Дж/см<sup>2</sup> привело к увеличению численности метаногена. Клетки водородиспользующего штамма М2<sup>T</sup> полностью погибли после облучения мощностью 202.1 Дж/см<sup>2</sup>. Устойчивость анаэробных архей к УФ объясняется особенностями среды, компоненты которой могут поглощать УФ-лучи. Другой возможный механизм устойчивости метаносарцин может заключаться в наличии SOD и SOR у этих анаэробных прокариот.

Влияние вакуумирования на штаммы S-6<sup>T</sup>, М2<sup>T</sup> и JL01 определяли помещением ватного тампона, пропитанного биомассой метаногена, после обработки вакуумом 10<sup>-5</sup> атм в течение 15 мин в пробирку Хангейта с соответствующей для конкретного штамма средой. Культивирование обработанных и контрольных пробирок проводили при оптимальной для каждой культуры температуре в течение 14 суток. Затем измеряли содержание метана в газовой фазе и сравнивали с контролем. Полученные результаты показали, что штамм JL01 не пережил условия эксперимента, а именно, помещение на тампон в тefлоновую пробирку для переноса в камеру, где проводили вакуумирование. Напротив, после вакуумирования штамм М2<sup>T</sup> образовывал метана столько же, а штамм S-6<sup>T</sup> почти в два раза больше метана, чем контрольные культуры.

По результатам предварительных экспериментов биомасса *M. mazei* S6<sup>T</sup>, была нанесена на хлопковое покрытие прибора «Тест» и установлена космонавтом - оператором на внешней поверхности МКС. После экспозиции в течение 12 месяцев биомасса метаносарцины была возвращена на Землю и до начала микробиологического исследования герметично закрытый прибор «Тест» с биомассой хранился в холодильнике. Определение выживаемости культуры после завершения эксперимента показало, что около 2% клеток метаносарцины осталось жизнеспособными в открытом космосе, несмотря на отсутствие питательных веществ и воды в течение длительного времени.

Проведенные эксперименты продемонстрировали до сих пор неизвестное свойство метаногенных архей переносить жесткие условия космического пространства, что делает вероятным привнесение жизни на Землю извне, подтверждая теорию панспермии.

#### Литература

1. Kral, T. A., Altheide, T. S., Lueders, A. E., & Schuerger, A. C. Low pressure and desiccation effects on methanogens: implications for life on Mars. *Planetary and Space Science*, 2011. V. 59(2-3). P. 264-270.
2. Reid, I. N., Sparks, W. B., Lubow, S., et al. Terrestrial models for extraterrestrial life: methanogens and halophiles at Martian temperatures. *Int. J. Astrobiol.*, 2006. V. 5 (2). P. 89-97.
3. Shcherbakova V., Oshurkova V., Yoshimura Y. The effects of perchlorates on the permafrost methanogens: implication for autotrophic life on Mars. *Microorganisms*, 2015. V. 3(3). P. 518-534.

## Изменение микробного сообщества почв древних земледельческих угодий

*Петросян А.А., Борисов А.В., Коробов Д.С.*

Пушкинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино;  
Alisa\_Mayakovskaya@bk.ru

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пушкино;  
a.v.borisovv@gmail.com

Институт археологии РАН, г. Москва; dkorobov@mail.ru

Проведено исследование уреазной активности почвы в окрестностях древних поселений на территориях предполагаемых бывших полей. Целью исследования было выявление закономерности изменения уреазной активности в почвах на разном удалении от древнего поселения.

В качестве объекта исследований была выбрана территория, прилегающая к поселению аланской культуры (5-8 вв. н.э.) в окрестностях г. Кисловодска. Уникальность этого региона заключается в том, что после прекращения функционирования поселений эпохи средневековья до настоящего времени почвы не распахивались и подвергались существенным антропогенным преобразованиям в последние годы.

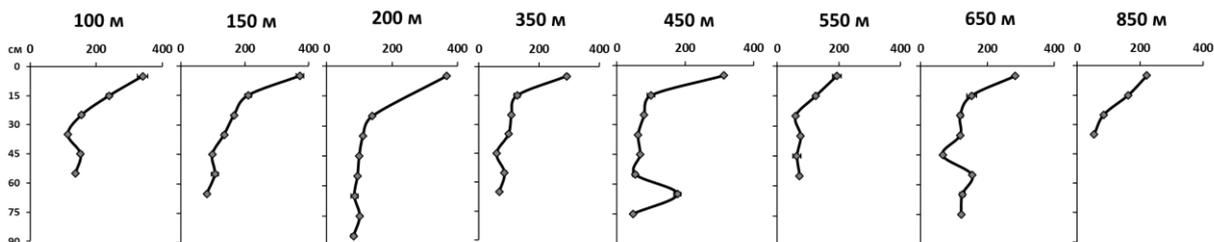
Ранее было установлено, что территория в окрестностях аланских поселений в данном регионе могла использоваться в качестве земледельческих угодий в эпоху средневековья (Борисов, Коробов, 2013). Этот вывод подтверждается обилием фрагментов керамики в почве. Предполагается, что керамика могла попадать в почву вместе с бытовым мусором и навозом, который вносился на поля (Wilkinson, 2008 (Цит. По. Борисов, Коробов, 2013)). Таким образом, в почвах в окрестностях средневековых поселений региона может сохраняться информация о тех изменениях почвенного микробного сообщества, которые были вызваны внесением навоза.

В работе использовался метод краткосрочного анализа уреазной активности почвы (Kandeler, Gerber E, 1988). Суть метода заключается в колориметрическом определении окрашенного комплекса  $\text{NH}_4^+$  после инкубации почвы с буферным раствором мочевины, и экстракцией аммония с хлоридом калия. Этот метод в последние годы активно используется при изучении следов древнего земледелия и скотоводства на территории археологических памятников (Чернышева и др. 2014, Chernysheva et al., 2015).

Согласно полученным результатам анализа уреазной активности почв, наибольшие значения этого показателя были выявлены в разрезах, близких к поселению. Эти разрезы были расположены в расстоянии 50, 100 и 150 м от памятника. Наименьшее значение в разрезах на удалении свыше 550 метров от поселения. В целом, для изменения данного показателя отмечается характерно выраженная тенденция в уменьшении уреазной активности по мере удаления от аланского поселения. Так, например, на максимальном удалении от памятника на расстоянии 1200 м. уреазная активность не превышает 250 мкг  $\text{NH}_4$  /г почвы час, в то время, как на расстоянии 100 метров достигает до 370 мкг  $\text{NH}_4$  /г почвы час.

Особое внимание следует обратить на пики уреазной активности, которые были выявлены в ряде разрезов (на расстоянии 150, 200, 450 и 650 м на глубине 65 – 90 см). Это связано, по всей видимости, с еще одним более древним этапом освоения территории. В этих разрезах под слоем почвы с керамикой аланского времени (5-8 вв. н.э.) были обнаружены фрагменты керамики кобанской культуры эпохи бронзы (9-6 вв. до н.э.). Возможно, в данном случае высокие значения уреазной активности в глубинных слоях почвы связаны с земледельческой практикой в эпоху бронзы.

Таким образом, в результате внесения удобрений в почвах древних сельскохозяйственных угодий произошло резкое возрастание активности фермента уреазы. Данные изменения сохранились в почве на протяжении более полутора тысяч лет. Ареал повышенных значений уреазной активности соответствует зоне регулярного внесения удобрений в эпоху средневековья. Таким образом, по данным изменениям этого показателя можно установить зону внесения удобрений.



Работа выполнена при поддержке РФФИ. Грант 18-09-00615 «Археология ресурсных зон: комплексное почвенно-археологическое изучение ландшафтов вокруг древних и средневековых поселений Кисловодской котловины»

#### Литература

1. Борисов А.В., Коробов Д.С. Древнее и средневековое земледелие в Кисловодской котловине: итоги почвенно-археологических исследований / М.: Таус, 2013. - 272 с
2. Wilkinson, K. Environmental archaeology. Approaches, techniques, applications / К. Wilkinson, С. Stevens. – Tempus, 2008. – 314 p.
3. Kandeler, E. Gerber E. Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium // Biol Fertil Soils. – 1988. – V. 6. – P. 68–72.
4. Чернышева Е.В., Каширская Н.Н., Коробов Д.С., Борисов А.В. Изменение биологической активности дерново-карбонатных почв Кисловодской котловины под влиянием древнего и современного антропогенного воздействия // Почвоведение, 2014. № 9. С. 1068-1076.
5. Chernysheva E.V., Korobov D.S., Khomutova T.E., Borisov A.V. Urease activity in cultural layers at archaeological sites // Journal of Archaeological Science. 2015. V. 57. P. 24-31.

### Новые бактериофаги Sam46 и Sam112, инфицирующие *Bacillus cereus sensu lato*

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

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
e.piligrimova@ibpm.ru

Бактериофаги – вирусы бактерий - широко используются для разработки антибактериальных препаратов, диагностических систем и инструментов геномной инженерии. Для более эффективного использования бактериофагов необходимо их изучение с использованием полногеномного секвенирования. В этой работе мы представляем новые бактериофаги, заражающие бактерии группы *Bacillus cereus*.

Бактериофаги Sam46 и Sam112 были выделены из почвы г. Самара и очищены с помощью нескольких циклов экстракции бляшек и титрования. По результатам

электронной микроскопии они относятся к семейству *Myoviridae*. Геномы фагов среднего размера ( $\approx 45$  тпн), кодируют 77 и 75 ОРС соответственно и идентичны на 96.9% нуклеотидной последовательности. Несмотря на почти полную идентичность геномной последовательности, бактериофаги имеют разный спектр хозяев среди представителей *Bacillus*. Сравнительный анализ последовательностей предсказанного протеома показал, что к числу наиболее родственных фагов относятся бактериофаги SPP1, Wes44 и Carmen17, имеющие до 28.3% общих белков с Sam46 и Sam112. Таким образом, описанные в рамках данной работы бактериофаги могут представлять новый род семейства *Myoviridae*.

## **Комплекс ассоциативных микромицетов липы крупнолистной (*Tilia platyphyllos* Scop.) в условиях города**

**Полякова Н.Н., Бондарева Е.В., Иванова И.О., Котоврасов С.В., Голымбовская С.А.**

ФГБНУ ВНИИ фитопатологии, Московская область, Большие Вяземы;  
polyakovnadezhda@yandex.ru

Растения рода липа (*Tilia* L.) отличаются уникальным адаптивным морфогенезом, что повышает их устойчивость к агрессивным урбанизированным условиям, газо- и дымоустойчивости, теневыносливости, морозостойкости и долговечности [1]. Цель исследования – изучить грибной комплекс в посадках липы крупнолистной в городских условиях.

В западном административном округе г. Москвы проведены визуальные рекогносцировочные обследования рожи из липы крупнолистной (*Tilia platyphyllos* Scop.). Лабораторные исследования выполнены на базе ФГБНУ ВНИИ фитопатологии в отделе патологии декоративных и садовых культур с применением стандартных микробиологических методов (влажная камера, метод посева на питательную среду Чапека с антибиотиком). Видовую принадлежность выделенных микромицетов определяли по культурально-морфологическим признакам с применением современных определителей для соответствующих таксономических групп. Структуру выделенных грибных комплексов характеризовали по показателю *частота встречаемости вида* (ЧВ в %). Терминология приведена в соответствии с Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). Полученные результаты проанализированы с применением программных возможностей *Microsoft Excell*.

По результатам визуальных обследований установлено, что к 1-ой категории состояния (здоровые) относится 46,2% деревьев, ко 2-й (ослабленные) – 50,0% деревьев, к 3-ей (сильно ослабленные) – 3,9% деревьев [2, 3]. На отдельных деревьях были отмечены физические повреждения (растрескивание, деформация коры, искривление, наросты и прочее), что ослабляет сопротивляемость липы к поражению вредителями (поражение обыкновенным паутинным клещом в сильной степени) и болезнями (колонизация фитопатогенными грибами), в том числе, через корневую систему.

Среди причин физических повреждений выделены: 1) капельная эрозия, в результате которой разрушаются почвенные агрегаты (деструкция) и формируется слабопроницаемая корка на поверхности почвы; 2) качество поливной воды, которая отличается щелочной реакцией (рН=7,7-7,8) и жесткостью (источник 1 - 346 ppm, источник 2 - 292 ppm). Неравномерное распределение влаги в зоне роста дерева – повышенная влажность воздуха и почвенная засуха, приводит к деформации ствола, кручению и отслоению коры, образованию трещин и поражению фитопатогенными организмами через поверхностные повреждения. При визуальном обследовании в ряде случаев была отмечена потеря тургора

листьями липы, появление тёмной окраски (поражение) водопроводящей сосудистой системы на срезе ветки в результате скопления камеди (гумми-вещества, закупоривающие сосуды), гибель отдельных скелетных ветвей растения. На ветвях 1-го порядка зарегистрирована парафилетическая или полифилетическая группа грибов *Zygomycetes*, с вегетативным телом и разветвлённым неклеточным многоядерным воздушным мицелием. При визуальном обследовании были отмечены косвенные признаки стволовой гнили - плохое зарастание сучьев, искривление ствола, раны и трещины.

Для уточнения данных визуальной диагностики были инструментально исследованы почвенные и растительные образцы и выделены следующие микромицеты:

- почва из корневой зоны растений – 1-ой категории состояния: *Alternaria* sp. (менее 8%), *Clonostachys* sp. (до 100%), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (75-100%), *Fusarium* sp. (8-10%), *F. fujikuroi* Nirenberg [=*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg] (до 33%), *Pythium* sp. (до 50%), *Rhizopus* sp. (до 50%), *Trichoderma* sp. (до 75%); 2-ой категории состояния: *Clonostachys* sp. (83-100%), *F. solani* (75-100%), *Fusarium* sp. (менее 16%), *Pythium* sp. (менее 8%); 3-ей категории состояния: *Aureobasidium* sp. (40-60%), *Clonostachys* sp. (25-100%), *F. oxysporum* Schltdl. (менее 67%), *F. sambucinum* Fuckel. (менее 17%), *F. solani* (80-100%), *Mucor* sp. (менее 50%), *Penicillium* sp. (менее 33%), *Pythium* sp. (50-70%).

- ветви, побеги, листья растений – 1-ой категории состояния: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Clonostachys* sp. (50-100%), *Cunninghamella* sp. (менее 10%), *F. solani* (до 100%); 2-ой категории состояния: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Clonostachys* sp. (до 100%), *F. solani* (90-100%), *Fusarium* sp. (менее 10%), *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Pythium* sp. (менее 25%), *Rhizopus* sp. (менее 5%), *Septoria* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp.; 3-ей категории состояния: *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Clonostachys* sp. (до 100%), *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* (40-60%), *F. sambucinum*, *F. solani* (8-100%), *Fusarium* sp. (менее 10%), *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. (до 100%), *Zygomycetes*.

В почвенных образцах зарегистрированы грибы рода *Rhizopus* (с ЧВ до 50%), которые относятся к факультативным термофильным паразитам и являются возбудителями сухой гнили. В случае сухого весенне-летнего периода создаются благоприятные условия (оптимальная температура воздуха – +30-35°C) для развития и активного проявления вредоносности данного патогена. В растительных образцах идентифицированы возбудители грибных заболеваний или микозов (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *Pythium* sp., *Rhizopus* sp., *Septoria* sp., *Verticillium* sp.), которые визуально проявляются в увядании (усыхании) листьев и молодых побегов, листовых пятнистостях, грибных налётах (плесень), некрозах, гнилях. Например, гриб *F. oxysporum* возбудитель трахеомикозных болезней у растений или увядания. *F. solani* является сапрофитным грибом и колонизирует мертвую органику или ослабленное растение, вызывая корневые гнили. Фузариозы наиболее стремительно распространяются в условиях крайних температур воздуха и почвы низких (менее +16°C) и высоких (выше +28°C), т.е. в условиях резких температурных колебаний. Отметим, что грибы рода *Fusarium* могут быть как первичными, так и вторичными патогенами или сапрофитами, которые колонизируют ткань, после того как корневая гниль, вызванная другими патогенами уже присутствует. Растения инфицируются в период роста и адаптации в открытом грунте.

В заключении отметим, что в условиях агрессивной городской среды (индикатор - обилие *Aureobasidium* sp. с ЧВ=50%, грибы рода *Fusarium*) древесные растения повреждаются физически (растрескивание, деформация коры и прочее) и становятся менее устойчивыми к поражению болезнями (заселение фитопатогенными грибами), в том числе, через почву и корневую систему.

## Литература

1. Larina G.E., Seraya L.G., Polyakova N.N., Baranova E.N. and Beloshapkina O.O. Ecological and biological features of adaptation of deciduous plants to chemical stress // Earth and Environmental Science (EES), 2019, vol. 350, iss. 1, no. 61 (article number 3501061).
2. Правила санитарной безопасности в лесах (утв. приказом Министерства природных ресурсов и экологии РФ от 24 декабря 2013 г. № 613). URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70563006/> (дата обращения 24.10.2019)
3. Серая Л.Г., Ларина Г.Е., Жуков Ф.Ф., Иванова И.О., Грибоедова О.Г., Петров А.В., Крашенинников С.В. Методические материалы: Комплекс действий по уходу за декоративными, садовыми и лекарственными растениями. Большие Вяземы, 2018 г., 128 с.

### **Характеристика микробиологического сообщества, изолированного с произведений темперной живописи 16-го века в Государственной Третьяковской галерее**

*<sup>1</sup>Потапов М. П., <sup>2</sup>Авданина Д. А., <sup>3</sup>Климкина К. М., <sup>3</sup>Федоров Д. Е.,  
<sup>3</sup>Веселовский В. А., <sup>2</sup>Жгун А. А.*

<sup>1</sup>Московский Политехнический Университет, г. Москва

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии, г. Москва

<sup>3</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва, mrk9804@gmail.com

В последние годы в многочисленных исследованиях показан значительный вклад микробиологического сообщества в повреждения произведений живописи, в частности, масляной живописи на холсте или темперной живописи [1–4]. В ряде экспериментов продемонстрировано, что биодеструкция наиболее эффективна в случае смешанных микробиомов, состоящих из грибов и бактерий [5].

В нашей работе отобрали микробиологические пробы с экспонатов темперной живописи 16-го века: икона «Церковь Воинствующая», бюст Георгия Победоносца, икона «Св. Великомученик Димитрий Солунский», находящихся в 61-ом зале Живописи Древней Руси основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский пер., 10, Москва). На самих произведениях темперной живописи отсутствовали видимые следы микробиологического роста. Однако эти экспонаты находились в зале, где в течение нескольких лет мониторинг определял значительное превышение фонового уровня для микробиоты музеев. Через неделю после отбора проб, экспонаты эвакуировали, вскрыли облицовку стен и обнаружили видимые глазом значительные очаги микробиологического поражения. Мы отобрали микробиологические пробы из очагов этих биопоражений, расположенных на внутренних коммуникациях, балках, перекрытиях, кабель-каналах, трещинах в потолках. Все образцы отобрали с разрешения Главного хранителя музейных ценностей Государственной Третьяковской галереи. Аликвоты отобранных проб использовали для инокуляции на стандартные микробиологические среды; для 106-ти отобранных проб получили 119 культур (62 культуры на среде CD и 57 культур на среде LB) [6]. Исходные пробы и полученные культуры предварительно охарактеризовали методами световой и электронной микроскопии, доминантные грибные виды генотипировали после секвенирования по Сенгеру ITS1, 5,8S и ITS2 районов рДНК [6,7]. Для определения потенциальной опасности изолированных культур для исследуемых экспонатов инокулировали 10 полученных

культур с доминантными грибными видами на 20 макетов, представляющих отдельные лакокрасочные материалы, используемые в темперной живописи. Методами ИК-Фурье и электронной спектроскопии показали эффективную биодеструкцию изучаемыми микробиомами большинства материалов (клеи, темперы с различными пигментами, пластификаторы, лаки) [6,7].

Для характеристики микробиомов в исходных пробах и в соответствующих им культурах, в том числе, используемых в качестве инокулятов на лакокрасочные макеты (после предварительной оптимизации условий амплификации гипервариабельных районов рДНК прокариот (V3/V4) и эукариот (ITS2) для «темперных» проб с минимальным исходным материалом [8]) провели метагеномное секвенирование на платформе MISEq Illumina. Для многих проб получили парное соответствие исходных проб и полученных на их основе культур (для доминантных культивируемых видов). Например, в пробе STG-S25, изолированной из трещины в иконе «Церковь Воинствующая», доминантным грибным видом является *Aspergillus versicolor*, доминантным прокариотическим - *Stenotrophomonas maltophilia*; эти же культивируемые виды – доминантны и в соответствующем культивируемом на среде Чапек-Докс изоляте, STG-25G. Также определили экспонаты (и их участки), частично обсемененные микроорганизмами из очагов биопоражений внутренних коммуникаций зала, или - без их следов. В наибольшей степени заражению подверглась икона «Св. Великомученик Димитрий Солунский»; в наименьшей степени – темперная поверхность иконы «Церковь Воинствующая». Отдельно провели сравнительный анализ перевиваемых 10-ти культур, используемых на протяжении года для инокуляции лакокрасочных материалов. Показали сохранение видового и процентного состава микробиоты. В результате метагеномного секвенирования также показали, в этих культурах практически полностью представлены доминантные грибные виды, что делает эксперименты по заражению макетных материалов репрезентативными.

Многие из определенных в результате метагеномного секвенирования доминантных микроорганизмов описаны ранее в литературе как биодеструкторы лакокрасочных материалов. Полученные данные о составе микробиоты инокулятов, эффективно растущих на отдельных макетных материалах, расширяют эти знания о микроорганизмах, способных поражать произведения темперной живописи. Эти данные также открывают возможность для детального анализа наших результатов по биодеструкции с применением ИК-Фурье спектроскопии и для подбора эффективных антисептиков нового поколения, специфически воздействующие на микроорганизмы и не повреждающие лакокрасочные материалы.

*Работа поддержана грантом РФФИ 17-29-04349.*

## Литература

1. López-Miras M, Piñar G, Romero-Noguera J, Bolívar-Galiano FC, Ettenauer J, Sterflinger K, et al. Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia* (Bologna). 2013;29: 301–314. doi:10.1007/s10453-012-9281-z
2. Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art--tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97: 9637–46. doi:10.1007/s00253-013-5283-1
3. Poyatos F, Morales F, Nicholson AW, Giordano A. Physiology of biodeterioration on canvas paintings. *J Cell Physiol*. 2018;233: 2741–2751. doi:10.1002/jcp.26088
4. Rosado T, Silva M, Dias L, Candeias A, Gil M, Mirão J, et al. Microorganisms and the integrated conservation-intervention process of the renaissance mural paintings from Casas

- Pintadas in Évora – Know to act, act to preserve. J King Saud Univ - Sci. 2017;29: 478–486. doi:10.1016/j.jksus.2017.09.001
5. López-Miras M del M, Martín-Sánchez I, Yebra-Rodríguez Á, Romero-Noguera J, Bolívar-Galiano F, Ettenauer J, et al. Contribution of the Microbial Communities Detected on an Oil Painting on Canvas to Its Biodeterioration. Chaturvedi V, editor. PLoS One. 2013;8: e80198. doi:10.1371/journal.pone.0080198
  6. Zhgun AA, Avdanina DA, Simonenko NP, Volkov IA, Ivanov VV. Detection of biodeterioration on materials used in tempera painting. Znan misel J. 2018;1: 7–15.
  7. Zhgun AA, Avdanina DA, Potapov MP, Stepanov MG, Shitov M V. Genotyping of microorganisms capable of damaging materials used in tempera painting. Znan misel J. 2018;20: 6–13.
  8. Zhgun AA, Potapov MP, Avdanina DA. Optimization of preparation stages for metagenomic sequencing of samples taken from XVI century tempera painting in State Tretyakov Gallery. Colloquium-journal. 2019;17 (41): 4–12.

## Инструменты микробиологии единичных клеток: краткий обзор

*Пучков Е.О.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН;  
puchkov@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_37-39

Термин "микробиология единичных клеток" (*англ.* single-cell microbiology) появился относительно недавно [1]. В этой области микробиологии сосредоточены проблемы, решение которых возможно только на уровне единичных клеток вместе с уникальным методическим аппаратом. Проблемы, на которые нацелена микробиология единичных клеток, это гетерогенность микробных популяций, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов между собой, а также с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. Развитие этой области микробиологии стало возможным лишь благодаря появлению *количественных методов анализа*, обеспечивающих необходимую чувствительность и разрешающую способность [2].

***Количественная оптическая микроскопия.*** Оптическая микроскопия, благодаря применению лазеров, высокочувствительных детекторов света, цифровой фотографии и компьютерной техники, трансформировалась в методологию, обеспечивающую *объективные количественные* исследования пространственно-временных и физико-химических характеристик объектов в масштабах единичных клеток. Особую роль в формировании этой методологии сыграли компьютерные методы обработки и анализа цифровых изображений [3]. Они позволили не только упростить, ускорить и автоматизировать многие уже имеющиеся количественные методы, но и обеспечили получение ранее недоступной на уровне отдельных микробных клеток количественной информации. Это спектральные свойства и их пространственное распределение; размер и форма индивидуальных компонентов сложной геометрии, их взаимное расположение; интенсивность и спектральные свойства свечения (например, флуоресценции); динамика процессов в широком интервале времен [4]. Разработаны уникальные методы сверхвысокого разрешения ("наноскопии"), которые открыли возможность исследования внутриклеточных структуры с размерами порядка 0.02 – 0.04 мкм и даже отслеживать локализацию и движение отдельных макромолекул [5].

**Сканирующая зондовая микроскопия.** Существует несколько вариантов этого метода. В области микробиология единичных клеток пока нашли применение только сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ) и сканирующая атомно-силовая микроскопия (САСМ). Так, в частности, возможность получать "химическое изображение" редокс-активности с помощью СЭХМ широко используется в изучении биопленок микроорганизмов [6]. САСМ обеспечивает получение изображений структуры поверхности нативных микробных клеток в водной среде (что выгодно ее отличает от сканирующей электронной микроскопии) с разрешением, позволяющим выявлять и идентифицировать молекулы полисахаридов, пептидогликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и других компонентов [7]. Основанные на САСМ подходы оказались также как и СЭХМ востребованными при изучении биопленок микроорганизмов [8].

**Цитометрия.** Различают проточную цитометрию (ПЦ), проточную цитометрию с визуализацией (ПЦВ) и сканирующую цитометрию (СЦ). ПЦ давно используется при изучении гетерогенности и экологии микробных популяций, для оценки жизнеспособности и физиологического состояния клеток [9]. Ведутся разработки методов избирательного препаративного выделения микроорганизмов с определенными свойствами на основе ПЦ [10]. Имеются подходы на основе ПЦВ для изучения фагоцитоза, например, интернализации бактерий в мононуклеарные фагоциты [11], для выявления морфологических изменений некоторых дрожжей, связанные с приобретением факторов патогенности [12] и ряд других. В качестве примеров применения СЦ можно отметить методики идентификации и количественного учета бактерий и грибов в различных природных [13] и клинических образцах [14].

**Нано масс-спектрометрия вторичных ионов.** Этот метод позволяет характеризовать наличие тех или иных химических соединений в исследуемых объектах на плоской поверхности с одновременной регистрацией их координат с разрешением в нанометровом диапазоне (получать "химическое изображение" объекта). Применение этого метода в изучении микроорганизмов на уровне единичных клеток достаточно полно отражено в обзоре [15]. В качестве примера отметим работу, в которой показаны возможности нано масс-спектрометрии вторичных ионов для изучения экологии бактерий по физиологическим характеристикам индивидуальных клеток в сопряжении с методом гибридизации ДНК *in situ* [16].

**Колебательная спектроскопия.** Характеристика молекул по колебательным энергетическим переходам может осуществляться с помощью инфракрасной и рамановской спектроскопии (РС). Однако только технические возможности рамановской спектроскопии позволяют ее использовать для регистрации колебательных спектров и таким образом определять химический состав отдельных микробных клеток. Разработано несколько методов, которые обладают достаточной чувствительностью для работы с единичными клетками микроорганизмов (микро-РС): SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy), CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) и RRS (Resonance Raman Spectroscopy) [17]. В качестве примера отметим применение TERS в исследовании поверхностных полисахаридов и пептидов бактерий, в том числе в динамике, а также для идентификации бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток [18]. Еще одно перспективное направление использования микро-РС связано с препаративным выделением отдельных клеток по определенным химическим характеристикам, своего рода химическим "отпечаткам пальцев", которые выявляются по рамановским спектрам [19].

Микробиология единичных клеток является сравнительно молодым направлением. Дальнейшее его развитие будет способствовать углублению знаний о мире микробов, а также использованию этих знаний в практических целях.

## Литература

1. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (3), 538-559.
2. Пучков Е.О. (2019) *Микробиология.* 88(1), 3-18.
3. Puchkov E. (2016) *J. Comp. Commun.* 4, 8-32.
4. Puchkov E. (2019) In: *Handbook of Single Cell Technologies.* (Eds. Santra T., Tseng F.G.) Springer, Singapore. pp.1-26.
5. Yao Z., Carballido-López R. (2014) *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 459-476.
6. Zoski C.G. (2016) *J. Electrochem. Soc.* 163(4), H3088-H3100.
7. Dufrière Y.F. (2014) *MBio.* 5(4), e01363-14.
8. Angeloni L., et al. (2016) *Nanoscience and Nanometrology.* 2(1), 30-40.
9. Emerson J.B., et al. (2017) *Microbiome.* 5(1)б 86.
10. Wang Y., et al. (2009) *ISME J.* 3(8)б 889-902.
11. Drechsler-Hake D., et al. (2016) *Int. J. Med. Microbiol.* 306(6), 357-366.
12. Okagaki L.H., et al. (2010) *PLoS Pathog.* 6(6).
13. Vanhee L.M., et al. (2010) *NATO science for peace and security series A: Chemistry and Biology.* Springer, pp. 25-41.
14. Pina-Vaz C., et al. (2004) *J. Clin. Microbiol.* 42(2), 906-908.
15. Gao D., Huang X., Tao Y. (2016) *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(5), 884-890.
16. Musat N., et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(46) 17861-17866.
17. Harrison J.P., Berry D. (2017) *Front. Microbiol.* 8, 675.
18. Neugebauer U., et al. (2007) *Chemphyschem.* 8(1), 124-137.
19. McIlvenna D., et al. (2016) *Lab Chip.* 16(8), 1420-1429.

### **Разнообразие прокариотного сообщества, ассоциированного с миксомицетом *Lycogala epidendrum***

**Сизов Л. Р., Лысак Л.В., Гмошинский В.И.**

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,  
г. Москва; Leo.Sizoff@yandex.ru

Миксомицеты по современной систематике относятся к группе Амоевозоа. Они имеют сложный жизненный цикл, включающий в себя стадию плодовых тел (спорофоров), схожих с грибными. Миксомицеты широко представлены в лесах умеренного пояса и являются важными компонентами фаготрофного комплекса лесных биоценозов. Однако исследований по изучению плодовых тел миксомицетов как специфических экологических ниш для бактерий практически не проводилось.

Целью нашей работы стало изучение разнообразия прокариотного сообщества, ассоциированного с плодовыми телами миксомицета вида *Lycogala epidendrum* и сравнение его с сообществами окружающих природных субстратов. Впервые для этого нами использовался метод высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Метод позволил определить состав и структуру прокариотных сообществ плодовых тел миксомицета, а также природных субстратов, сопряженных с миксомицетом – древесины и листового опада. Все образцы были отобраны на пробной площадке в Битцевском лесу осенью 2018 года.

Результаты анализа прокариотного сообщества показали, что на плодовых телах *L. epidendrum* доминировали представители филума Proteobacteria (98% от всех прокариот), при этом содержание бактерий рода *Pseudomonas* доходило до 79 %. В значительно меньших количествах присутствовали филумы Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria,

Acidobacteria и Chlorobi. В прокариотном сообществе листового опада также преобладали бактерии филума Proteobacteria (79%), представленные в основном родами *Pseudomonas* (40%) и *Massilia* (10%). При этом таксономический состав прокариотного сообщества опада был более разнообразен, присутствовали филумы Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Chlorobi, Fusobacteria, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus. Прокариотное сообщество древесины характеризовалось меньшим разнообразием и значительно отличалось от сообщества опада и плодовых тел. Доминировали бактерии филумов Acidobacteria (47%), в том числе род *Granulicella*, и Proteobacteria (45%), однако доминирования рода *Pseudomonas* в отличие от сообществ других субстратов не обнаружилось. Кроме того, выявлено в структуре сообщества содержание филумов Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Actinobacteria, Cyanobacteria и Saccharibacteria.

По количеству представленных филумов и ОТЕ, определенных до рода, сообщество *L. epidendrum* (31 род из 6 филумов) сильно уступало сообществам и опада (80 родов из 12 филумов), и древесины (58 родов из 7 филумов). Наибольшее альфа-разнообразие по количеству ОТЕ наблюдалось на древесине (индекс Шеннона 5,5), тогда как на *L. epidendrum* этот индекс составил лишь 0,8. Альфа-разнообразие подстилки близко к показателям древесины (4,7). По метрике Брея-Кертиса сообщество миксомицета ближе к сообществу подстилки (0,97), чем древесины (0,99). Аналогичные результаты дала метрика weighted UniFrac (0,91 с подстилкой и 0,94 с древесиной).

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что прокариотное сообщество, ассоциированное с плодовыми телами *L. epidendrum*, характеризовалось меньшим таксономическим разнообразием, чем субстрат, на котором развивается миксомицет (древесина), и близлежащий листовый опад. На поверхности плодовых тел *L. epidendrum* в прокариотном сообществе преобладают представители филума Proteobacteria, главным образом бактерии рода *Pseudomonas*. По филогенетической структуре сообщество спорофоров ближе к сообществу листового опада, чем к сообществу древесины.

## **Штаммы *Bacillus anthracis*, выделенные из вечной мерзлоты тундровой зоны России**

***Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Богун А.Г.,  
Кисличкина А.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А.***

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ), г. Оболенск, info@obolensk.org

Вечная мерзлота - часть криолитозоны, характеризующаяся отсутствием периодического протаивания. Ее площадь достигает более 60% территории России. Благодаря поддержанию в ней отрицательных температур в течении длительного времени, достигающего десятков тысяч лет, она может быть резервуаром микроорганизмов, законсервированных в ней в момент ее образования или последнего оттаивания. Поэтому из нее могут быть выделены архаичные формы микроорганизмов, которые представляют интерес как с точки зрения изучения эволюции данного патогена, так и с точки зрения их возможного влияния на современные экосистемы при таянии мерзлоты либо при вовлечении этих территорий в хозяйственную деятельность, например, при геологических изысканиях.

Особый интерес в этом плане представляют патогенные микроорганизмы, способные сохраняться в мерзлоте и становиться причинами вспышек тех или иных заболеваний.

Одним из таких микроорганизмов является *Bacillus anthracis* - спорообразующая бактерия, вызывающая сибирскую язву. Именно способность к образованию эндоспор, длительно сохраняющих жизнеспособность, во многом определяет высокий эпидемиологический потенциал и широкую распространенность этого микроорганизма. Даже в условиях умеренного климата споры *B. anthracis* сохраняют жизнеспособность в почве десятки лет. При пониженных температурах, например, в условиях вечной мерзлоты, сохранность микробиоты, тем более находящейся в споровой форме, должна быть значительно выше. В данной работе мы обобщаем результаты изучения штаммов, выделенных во время двух независимых событий:

1) Вспышка сибирской язвы на Ямале.

В июле-августе 2016 г. на Ямальском полуострове произошла вспышка сибирской язвы среди северных оленей, в ходе которой погибло более 2600 оленей, а также было зарегистрировано 36 случаев заболевания среди людей (один - с летальным исходом). Эпидемия охватила территорию протяженностью более 250 км, причем отдельные очаги заболевания были разграничены двумя водными барьерами - Обской губой (ширина от 30 до 80 км) и устьем Тазы (средняя ширина 25 км). При этом границы очага отстояли от точек, где сибирская язва регистрировалась в прошлом не менее, чем на 30 км. Все выделенные в очаге штаммы, независимо от точки выделения и их источника по *can*SNP-генотипу относились к линии V.Br.001/002, обладали идентичным MLVA- и полногеномным SNP- профилем, что указывает на общий источник заражения во всем эпидочаге. По результатам эпидрасследования причинами возникновения эпидемии стали, во-первых, отказ от вакцинации оленей от сибирской язвы в 2007г., обусловленный длительным отсутствием этого заболевания на Ямале (последняя вспышка зарегистрирована в 1941г.) и, во-вторых, аномальная летняя жара, которая, с одной стороны, ослабила оленей, сделав их более восприимчивыми к заболеванию, с другой - привела к оттаиванию мерзлоты и вымыванию спор возбудителя на поверхность почвы.

2) Обнаружение жизнеспособных спор *B. anthracis* в вечной мерзлоте Якутии.

12 августа 2015 года на берегу реки Уяндины в Абыйском улусе Якутии (N68.564567, E144.769827) в вечной мерзлоте были найдены два котенка пещерного льва *Panthera leo spelaea*. 21 сентября 2016 года в этой точке были отобраны пробы почвы с глубины от одного до шести метров с интервалом в один метр, и в декабре 2016 доставлены в ФБУН ГНЦ ПМБ. В месте отбора грунта сибирская язва ранее не регистрировалась, тем не менее, из образцов, отобранных на глубине 2, 3 и 4 метра мы выделили несколько десятков жизнеспособных вирулентных изолятов *B. anthracis*. По MLVA-профилю они были отнесены к трем различным штаммам, названным 3Ya, 4Ya и 5Ya. По *can*SNP-профилю штаммы 3Ya, 4Ya были отнесены к линии A.Br.008/011, а 5Ya к линии V.Br.001/002, как и Ямальские изоляты. Кроме того, между ямальскими штаммами и штаммом 5Ya было выявлено крайне высокое сходство по MLVA-профилю (различие лишь по одному локусу из 15-ти). Полногеномный SNP анализ показал, что они различаются по 65-ти SNP.

Нахождение штаммов в мерзлоте поднимает вопрос их датировки. К сожалению, и раскопки пещерного льва, и отбор проб почвы проводился не специалистами, из-за чего провести геологическую датировку образцов не представляется возможным. Тем не менее мы можем оперировать данными анализа полногеномных последовательностей описываемых штаммов, а также штаммов из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ, наиболее схожих с ямальскими и якутскими по MLVA-профилю (n=4) и общедоступных последовательностей геномов *B. anthracis* (n=672). В ходе работы мы пришли к следующим выводам:

1. Географическое распространение линии A.Br.008/011 и выделение в ее рамках отдельных филогеографических групп в Европе (Италия, Болгария, Франция), Турции и

Китае произошло, согласно современным представлениям, в XIII-XVI вв. Относящиеся к этой линии, как мы выяснили, якутские штаммы 3Ya и 4Ya, не дают оснований для пересмотра датировки, а только расширяют географический ареал распространения этой линии.

Мы можем связать распространение линии A.Br.008/011 по Сибири, Европе, Ближнему Востоку и Китаю лишь с одним историческим событием, которое охватило все перечисленные регионы в данный период – с монгольской экспансией. При этом в указанных областях происходило передвижение значительных воинских контингентов и, в связи с этим, больших масс восприимчивых к сибирской язве животных – лошадей, коров, верблюдов и овец, что могло способствовать распространению штаммов линии A.Br.008/011. К XVI веку произошел окончательный развал монгольской империи и завоевание западных постчингизидских государств Московским царством, что сделало невозможным свободное передвижение войск и животных из Дальнего востока в Европу. При этом ряд генетических особенностей якутских штаммов позволяет предположить, что штамм 3Ya (глубина 2 метра), по всей видимости, наиболее молодой и был законсервирован в грунте в XVII-XVIII вв., штамм 4Ya (глубина 2 и 3 метра), несколько старше и датируется XIV-XV вв.

2. Крайне высокая степень генетического родства штаммов 5Ya, ямальских изолятов и еще ряда штаммов из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ, выделенных в Сибири и северной Европе дала нам основания для выделения «сибирской» филогеографической группы в пределах линии V.Br.001/002. К сожалению, нам не удалось предложить датировку этих штаммов из-за малочисленности указанной группы. Но, учитывая глубину обнаружения штамма 5Ya (4 метра), можно предположить, что он несколько старше штаммов 3Ya и 4Ya. В таком случае распространение этой филогеографической группы через Сибирь в Северную Европу также можно было бы увязать с началом монгольских завоеваний в XIII в. которые, в частности, вызвали усиленную миграцию скотоводческих племен (предков ненцев и эвенков) на Ямальский полуостров и в Якутию.

Для дальнейшего подтверждения, корректировки, или опровержения этих гипотез требуется поиск новых штаммов *B. anthracis* в вечной мерзлоте Сибири и их последующее изучение.

## **Бактерии рода *Azospirillum*: новые местообитания и новые свойства**

***Тихонова Е.Н., Хуснетдинова К.А., Кравченко И.К.***

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» (ФИЦ Биотехнологии РАН),  
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, г. Москва; katerina\_inmi@mail.ru,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_42-44

Бактерии рода *Azospirillum*, наряду с псевдомонадами и бациллами, являются одними из наиболее интенсивно исследуемых ассоциативных партнеров растений. Они стимулируют рост и развитие растений, колонизируя поверхности корней и стеблей, а также внутренние ткани корня без образования специализированных структур. Это обуславливает широкое применение азоспирилл в качестве биоудобрений [1].

В настоящее время известно 17 валидно описанных азоспирилл, причем значительная их часть была выделена из ризосферы дикорастущих или сельскохозяйственных растений. Несмотря на многочисленные экологические исследования, информация о существовании *Azospirillum* вне ризосферы и филлосферы высших растений весьма ограничена. В последние годы появились данные о выделении

азоспирилл из нетипичных для них местобитаний. *A. rugosum* [2] и *A. picis* [3] были выделены из загрязненной нефтью почвы и дорожной смолы, соответственно. *A. thiophilum* выделена из серного источника Ставропольского края и продемонстрировала способность к литогетеротрофному росту в микроаэрофильных условиях с одновременным использованием органических субстратов и тиосульфата в качестве донора электронов [4]. *A. humicireducens* [5] была изолирована с поверхности электрода микробного топливного элемента.

В 2007 году нами впервые были выделены штаммы *Azospirillum* sp. B2, B21, B22 из почвы кислого верхового болота Тверской области как компоненты накопительных метанооксиляющих культур [6]. Стоит отметить, что попытки выделения бактерий рода *Azospirillum* непосредственно из этих образцов торфа не увенчались успехом. В 2018 году из образца торфа, отобранного из осушенного болота Московской области, был выделен штамм *Azospirillum* sp. Sh 1.

Нами была высказана гипотеза, что метаболическая пластичность азоспирилл позволяет им выживать в необычных условиях кислых болот при отсутствии высших сосудистых растений. Одним из способов такого приспособления может быть использование одноуглеродных соединений, в первую очередь метанола, который может образовываться как промежуточный продукт микробного окисления метана в условиях недостатка кислорода, а также за счет микробного разложения пектиновых веществ. В качестве популяционного механизма реализации этой возможности рассматривается образование ассоциаций с метанотрофными бактериями [7].

Способность к метилотрофии у бактерий рода *Azospirillum* была подтверждена результатами физиологических и генетических тестов. Анализ тотальных геномов показал, что процесс окисления метанола у азоспирилл, выделенных из болот, осуществляется разными ферментными системами. Так для штаммов *Azospirillum* sp. B21 и B22, как и у большинства метилотрофных бактерий, установлено наличие как MxaF и HoxF генов. В то же время, у *Azospirillum* sp. B2 обнаружен только ген HoxF [8], что ранее было показано исключительно для метанотрофных веррукобактерий.

Анализ полученных изолятов показал, что они относятся как к известным видам, так и к новым. Штаммы B21 и B22 по данным анализа геномов относятся к *Azospirillum oryzae* [9]. Штамм B2 описан нами как в качестве нового вида *Azospirillum palustre* [10]. *Azospirillum* sp. Sh1 также относится к новому виду и находится в процессе описания [9].

Расширение сведений о местах обитания влечет за собой развитие взглядов на прикладные свойства этой группы организмов. Установлено, что азоспириллы могут образовывать ассоциации не только с высшими растениями, но и с цианобактериями [11]. Выделение физиологически активных веществ азоспириллами стимулирует рост микроводорослей, что способствует улучшению производительности для биотехнологических применений. Способность к образованию азоспириллами экзополисахаридов в ассоциации с метилотрофами позволяет сообществу выживать в форме биопленок, что обеспечивает лучший срок хранения и снижение стресса у инокулированных растений [12].

В ходе изучения физиологических и ростовых характеристик штамма *Azospirillum* sp. Sh1 обнаружено, что при использовании метанола в качестве источника углерода продуцируется большое количество полигидроксиалканатов (ПГА), которые в настоящее время являются перспективным сырьем для производства биоразлагаемого пластика, применяемого в производстве различных продуктов [13]. Использование метанола в качестве дешевого субстрата открывает новые возможности решения новых биотехнологических задач с участием бактерий рода *Azospirillum*.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00390.*

## Литература

1. Евстигнеева С.С., Федоренко Ю.П. Биотехнологический потенциал бактерий рода *Azospirillum*: Характеристика флокулирующих культур как наиболее перспективных форм для инокуляции растений. *Актуальная биотехнология*. 2018. 3 (26): 98-102.
2. Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008. 58: 959–963.
3. Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B. et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009. 59: 761–765.
4. Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V. et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010. 60: 2832–2837.
5. Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L. et al. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013. 63: 2618–2624.
6. Дорошенко Е.В., Булыгина Е.С., Спиридонова Е.М., Турова Т.П., Кравченко И.К. Выделение и характеристика азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* из почвы сфагнового болота. *Микробиология* 2007. 76(1): 107–115.
7. Хуснетдинова К.А., Тихонова Е.Н. Азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* как компонент микробных сообществ сфагнового болота. В сборнике *Науки о биосфере: инновации / серия: Ecological Studies, Hazards, Solutions. Volume 25*. Отв. редакторы С.Н.Орлов, С.В.Котелевцев, С. А. Остроумов, О.М.Горшкова, М.: МАКС Пресс, 2018. 182-185.
8. Grouzdev D.S., Tikhonova E.N., Krutkina M.S., Kravchenko I.K. Genome Sequence of Methylophilic *Azospirillum* sp. Strain B2, Isolated from a Raised *Sphagnum* Bog. *Genome Announcements*. 2018. 6 (23): e00492-18.
9. Grouzdev D.S., Tikhonova E.N., Kravchenko I.K. Genome Sequences of Type Strains *Azospirillum lipoferum* 59b<sup>T</sup> and *Azospirillum oryzae* COC8<sup>T</sup>, and Novel *Azospirillum* sp. Strains B21 and Sh1, Isolated from Raised *Sphagnum* Bogs. *Microbiology Resource Announcements*, in press.
10. Tikhonova E.N., Grouzdev D.S., Kravchenko I.K. *Azospirillum palustre* sp.nov., a methylophilic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019.69(9): 2787-2793.
11. Amavizca E., Bashan Y., Ryu C.-M., Farag M.A., Bebout B.M., de-Bashan L.E. Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific Reports*. 2016. 7: 41310.
12. Joe M.M., Saravanan V.S., Islam M.R., Sa T. Development of alginate-based aggregate inoculants of *Methylobacterium* sp. and *Azospirillum brasilense* tested under in vitro conditions to promote plant growth. *Journal of Applied Microbiology*. 2013. (116): 408-423.
13. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2014. (7): 103-133.

## Галофильный облигатный метилотроф *Methylobacterium halotolerans* C2 экспрессирует три изоформы PQQ-зависимых метанолдегидрогеназ

Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Канаруллина Е.Н.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
torgonskaya@ibpm.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_45-47

Аэробные метилотрофные бактерии, использующие C<sub>1</sub>-соединения в качестве источников углерода и энергии, окисляют метанол с помощью специализированных ферментов – метанолдегидрогеназ (МДГ). Грамположительные метилотрофы обладают цитоплазматической НАД(Ф)<sup>+</sup>-зависимой МДГ, тогда как у грамотрицательных бактерий функционируют периплазматические ферменты, использующие в качестве кофактора пирролохинолинхинон (PQQ). Классическая PQQ-МДГ содержит в активном центре Ca<sup>2+</sup> и представляет собой α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>-гетеротетрамер из больших (MxaF) и малых (MxaI) субъединиц. У некоторых представителей порядков *Burkholderiales* и *Rhodocyclales* выявлена менее распространенная PQQ-алкоголдегидрогеназа MDH2 с низким сродством к метанолу [Троценко и соавт., 2010 для обзора]. Еще один необычный тип PQQ-МДГ – ХохF был выявлен недавно при секвенировании геномов метилотрофных бактерий. Белок ХохF демонстрирует <50% сходства с белками MxaF и для каталитической активности требует присутствия ионов лантаноидов (Ln<sup>3+</sup>) [Chistoserdova, 2016]. В отличие от генов *mxa* и *mdh2*, ген *hoxF* присутствует у всех известных грамотрицательных метилотрофов, а также у ряда организмов, для которых не описана способность к росту на метаноле. При этом в геномах многих бактерий присутствуют множественные, иногда дивергентные копии ХохF, что в настоящее время рассматривается как свидетельство распространения соответствующих генов путем горизонтального переноса [Taubert et al., 2015].

Недавнее секвенирование генома галофильного облигатного метилотрофа *Methylobacterium halotolerans* C2 [Vasilenko et al., 2016] выявило наличие у него трех детерминант, кодирующих PQQ-МДГ – кластера генов *mxa* (локус A7A08\_02427-A7A08\_02437) и двух кластеров генов *hox* (A7A08\_02420-A7A08\_02423 и A7A08\_02537-A7A08\_02539), первый из которых содержал разрыв рамки считывания *hoxF*. Проведенная нами проверка данного участка с помощью специально сконструированных пар праймеров продемонстрировала, что в структуре гена и непосредственно перед ним были ошибочно пропущены два нуклеотида. Следовательно, оба гена *hoxF* у штамма C2 полноразмерны и могут быть функциональными.

Известные белки ХохF филогенетически разнообразны и условно подразделяются на, как минимум, пять групп (ХохF1-5), причем идентичность их последовательностей в пределах одной группы составляет >65-70%, тогда как между ними – ниже 50% [Chistoserdova, 2016]. Филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей детерминант *hoxF* у штамма C2 показал, что белок, кодируемый локусом A7A08\_02420-A7A08\_02421, принадлежит к группе ХохF1, тогда как продукт гена A7A08\_02537 является представителем группы ХохF3. Следует отметить, что, в отличие от распространенных белков типа ХохF3, детерминанты ХохF1-группы были найдены пока лишь у небольшого числа микроорганизмов – анаэробного метанотрофа '*Candidatus Methylobacterium mirabilis oxyfera*', патогенов растений из рода *Xanthomonas*, представителей семейства *Beijerinckiaceae*, а также близкородственного *M. halotolerans* C2 факультативного морского метилотрофа *Methyloceanibacter caenitepidi* [Taubert et al., 2015 для обзора]. Таким образом, изучение МДГ ХохF1-типа у *M. halotolerans* C2 представляет большой интерес.

Для оценки активности экспрессии выявленных генов PQQ-МДГ в *Ml. halotolerans* С2 на основе беспромоторного зонд-вектора широкого круга хозяев pCMgfp [Firsova, Torgonskaya, 2019] нами были сконструированы репортерные плазмиды, несущие ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP) под контролем промоторов генов *mxaF*, *хоxF1* и *хоxF3* – pCMgfp:C2PmxaF, pCMgfp:C2PхоxF1 и pCMgfp:C2PхоxF3. Конструкции переносили в клетки штамма С2 методом двуродительского скрещивания с использованием *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir, и в клетках полученных репортерных штаммов измеряли флуоресценцию GFP на флуориметре FLUOstar OPTIMA (“BMG Labtech”, Германия), при длинах волн: возбуждения – 485 нм, эмиссии – 510 нм. В результате установлено, что при росте *Ml. halotolerans* С2 на минеральной среде MAMS с метанолом происходит активная экспрессия всех трех генов PQQ-МДГ (Рис. 1). Кроме того, в отличие от промоторов генов *mxaF* и *хоxF3*, промотор гена *хоxF1* оказался способен функционировать и в гетерологичном хозяине – *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir.

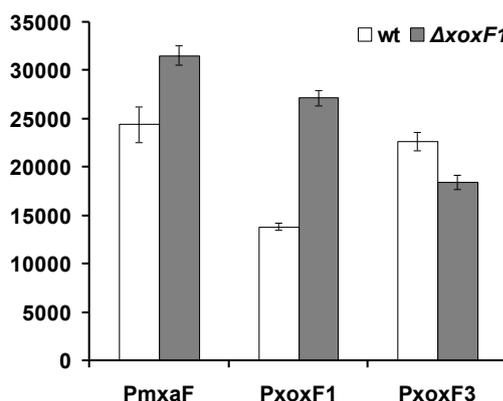


Рис. 1. Флуоресценция клеток (тыс. ед./ОП<sub>600</sub>) трансконъюгантов *Ml. halotolerans* С2 дикого типа (wt) и нокаут-мутанта по гену *хоxF1* ( $\Delta$ *хоxF1*), несущих плазмиды pCMgfp:C2PmxaF, pCMgfp:C2PхоxF1 и pCMgfp:C2PхоxF3, при росте на среде MAMS с 3% NaCl и 120 мМ метанола (ОП<sub>600</sub>=0.5). В качестве базового уровня (581.1) использован показатель для штамма с беспромоторным вектором pCMgfp.

Полученный нами методом сайт-специфической гомологичной рекомбинации нокаут-мутант штамма С2 с разрывом гена *хоxF1* кассетой устойчивости к гентамицину (С2  $\Delta$ *хоxF1*, Gm<sup>R</sup>) сохранил способность к росту на метаноле в среде MAMS, однако на среде «К» рост отсутствовал. Мы предполагаем, что этот эффект объясняется различием указанных сред по содержанию кальция (152 и 0 мкМ, соответственно), присутствие которого может стимулировать экспрессию классической PQQ-МДГ. Анализ активности промоторов генов МДГ у мутанта С2  $\Delta$ *хоxF1*, проведенный с помощью вышеописанных репортерных конструкций, подтверждает предположение о компенсаторной активации синтеза классической PQQ-МДГ в отсутствие функционального ХохF1 при росте на среде MAMS с метанолом, а также демонстрирует усиление экспрессии с промотора разрушенного гена (Рис.1). Разрушение гена *хоxF1* у штамма С2 не привело к блокировке экспрессии гена *mxaF*.

Итак, нами показано, что галофильный облигатный метилотроф *Ml. halotolerans* С2 экспрессирует гены всех трех закодированных в геноме PQQ-зависимых МДГ, однако для выяснения механизмов регуляции их синтеза требуются дальнейшие исследования.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01148-а.*

## Литература

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2010. 325 с.
2. *Chistoserdova L.* Lantanides: new life metals // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V.32. P.138.
3. Taubert M., Grob C., Howat A.M., Burns O.J., Dixon J.L., Chen Y., Murrell J.C. HoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is widespread in coastal marine environments // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 3937–3948.
4. Vasilenko O.V., Doronina N.V., Shmareva M.N., Tarlachkov S.V., Trotsenko Yu.A. Draft genome sequence of *Methyloligella halotolerans* C2<sup>T</sup>, a new halotolerant methylotroph, accumulating poly-3-hydroxybutyrate and ectoine // *Genome Announcements.* 2016. V. 4(5). P. e01189-16.
5. Firsova Y.E., Torgonskaya M.L. Different roles of two *groEL* homologues in methylotrophic utiliser of dichloromethane *Methylorubrum extorquens* DM4 // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2019. DOI: 10.1007/s10482-019-01320-5.

### Разнообразие цианобактерий озера Хагийн Нуур (Монголия)

<sup>1</sup>Цыренова Д.Д., <sup>2</sup>Норовсүрэн Ж.

<sup>1</sup>Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, baldanovad@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт биологии АНМ, г. Улан-Батор, Монголия; norvo@mail.ru

Содовые и соленые озера, сочетающие экстремально высокие значения рН с повышенными концентрациями солей вплоть до насыщения, стали в последнее время объектом интенсивного изучения. Это связано, прежде всего, с тем, что такие озера считаются центрами возникновения микробного разнообразия и местами сохранения уникальных реликтовых микробных сообществ, основными доминантами в которых являются цианобактерии (Заварзин, 1993; Заварзин, Жилина, 2000). Цианобактерии играют ключевую роль в геохимии галинных систем и вносят значительный вклад в циклы основных биогенных элементов, поскольку являются главным источником органического вещества (Заварзин, 2007; Герасименко, 2007).

**Цель исследования** - изучение видового разнообразия цианобактерий содового озера Хагийн Нуур (Монголия). В связи с этим были поставлены следующие задачи: определить таксономический состав цианобактерий; выделить монокультуры цианобактерий.

Отбор проб воды для микробиологических работ проводили по общепринятой методике (Водоросли..., 1989). Для определения видового состава цианобактерий пробы фиксировали 4% формалином. Микроскопирование цианобактерий проводили с помощью микроскопа Axiostarplus (CarlZeiss, Германия). Определение таксономической принадлежности цианобактерий на основании морфологических признаков проводили по Еленкину, Голлербаху (Еленкин, 1949; Голлербах и др., 1953). Для получения активных накопительных культур цианобактерий была выбрана среда «Z8».

Объектом исследования являлось содовое озеро Хагийн Нуур расположенное в Сайхан сомоне Булганского аймака Монголии. Это озеро находится между четырьмя горами: Чачирт, Рашаант, Сайхан и Хуримт. Значение рН воды озера было щелочным.

Определение таксономического состава озера Хагийн Нуур на основе морфологических признаков показало, что в воде озера присутствовали представители 2 родов – *Phormidium* и *Oscillatoria*. Доминирующим видом являлся *Phormidium frigidum*.

Из воды исследуемого озера были выделены три монокультуры цианобактерий. Две культуры отнесены к роду *Phormidium* (семейство *Phormidiaceae*) – *Ph.frigidum* и *Ph.ambiguum*, одна культура являлась представителем рода *Oscillatoria* (семейство *Oscillatoriaceae*) – *O.brevis*.

В целом, полученные результаты показали, что в данном озере Хагийн Нуур развивается специфичное цианобактериальное сообщество, приспособленное к условиям резко континентального климата региона.

В исследованном озере Хагийн Нуур Сайхан сомона Булганского аймака Монголии впервые изучено цианобактериальное разнообразие, выделены и описаны монокультуры цианобактерий.

#### Литература

1. Водоросли. Справочник / Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. и др. – Киев: Наук. думка, 1989. - С. 170–188.
2. Герасименко Л.М. Алкалофильные оксигенные фотосинтезирующие организмы / Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Вып. 14: Алкалофильные микробные сообщества / отв. Ред. В.Ф. Гальченко. – М.: Наука, 2007. – С. 88-157.
3. Голлербах, М.М. Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР, вып. 2[Текст] / Советская наука, М.: 1953. 57с
4. Еленкин А.А. Синезеленые водоросли СССР. Спец. часть. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1949. Вып. 2. 1908 с.
5. Заварзин Г.А. Эпиконтинентальные содовые водоемы как предполагаемые реликтовые биотопы формирования наземной биоты // Микробиология. - 1993. -Т.62 - С. 789-800.
6. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н. Содовые озера – модель древней биосферы континентов // Природа, 2000. - №2. - С. 45 – 53.
7. Заварзин Г.А. Образование содовых условий как глобальный процесс. / Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Вып. 14: Алкалофильные микробные сообщества / отв. Ред. В.Ф. Гальченко. – М.: Наука, 2007. - С. 8-57.

### **Новый вид аэробных метилотрофных бактерий рода *Starkeya* из активных илов**

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
chemodurova.alina@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_48-50

Аэробные метилотрофные бактерии (метилотрофы) - физиологическая группа микроорганизмов, обладающая уникальной способностью использовать метан (метанотрофы) и его окисленные и замещенные производные в качестве источников углерода и энергии.

Метилотрофы характеризуются большим функциональным разнообразием и приобретают все большую экологическую значимость, поскольку на фоне глобального кризиса состояния окружающей среды увеличивается число местообитаний с высоким содержанием токсичных и канцерогенных  $C_1$ -соединений.

Цель нашей работы - физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика трех новых метилотрофных изолятов - штаммов ЗС, 1А и 8Р, выделенных из разных проб активных илов очистных сооружений г. Москвы.

Исследуемые изоляты представлены аэробными, грамотрицательными, неподвижными, неспорообразующими палочками, размножающимися бинарным делением (рис.1).

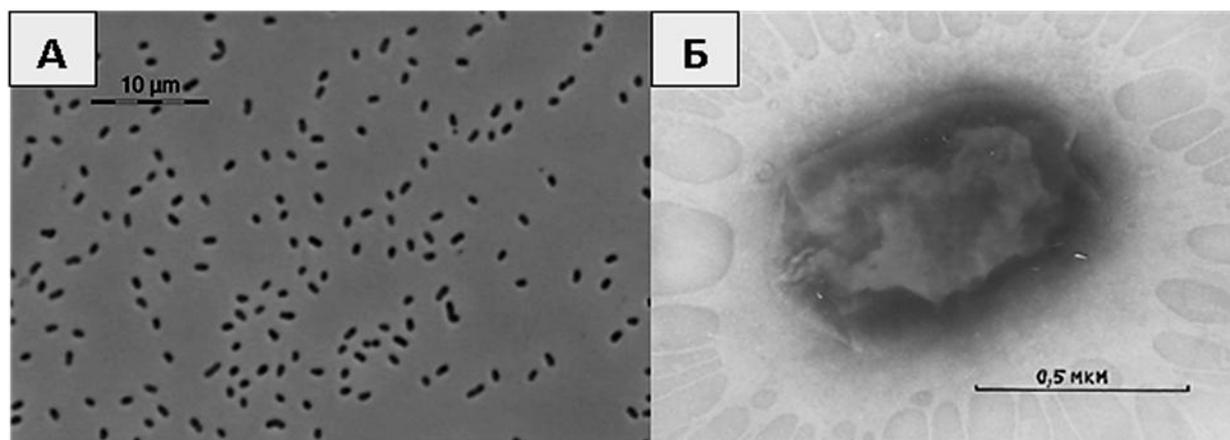


Рис. 1. Морфология клеток штамма 3C<sup>T</sup>. А – фазовый контраст (длина масштабной метки 10 мкм). Б – негативный контраст (длина масштабной метки 0,5 мкм).

Растут при 17-42 °С (оптимально 25-30 °С) и при pH 6.0-8.5 (оптимально 6.8-7.5). Все три штамма используют метанол, формиат и широкий спектр полиуглеродных субстратов. Окисляют метанол через формальдегид и формиат соответствующими дегидрогеназами до CO<sub>2</sub>, который ассимилируют рибулозобисфосфатным путем (имеют активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы и фосфорибулокиназы). В жирнокислотном составе клеток преобладают C<sub>18:1ω7c</sub> и C<sub>19:0</sub>. Основной убихинон-Q<sub>10</sub>. Содержание ГЦ пар в ДНК составляет 68.2 (штамм 3С), 67.6 (штамм 1А), 68.5 (штамм 8Р) мол.% (Тпл). Согласно результатам филогенетического анализа, основанного на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, штаммы имеют высокий уровень сходства между собой (99.9-100%) и близки к известным представителям рода *Starkeya* - *S. novella* DSM 506<sup>T</sup> (98.8%) и *S. koreensis* KCTC 12212<sup>T</sup> (99.2%). ДНК-ДНК гибридизация выявила высокий уровень гомологии изолятов между собой (80-97%), однако уровень ДНК-ДНК гомологии штамма 3С<sup>T</sup> с *S. novella* DSM 506<sup>T</sup> и *S. koreensis* KCTC 12212<sup>T</sup> составил только 50±2 %. На основании полученных данных штаммы 3С, 1А, 8Р классифицированы как представители нового вида рода *Starkeya*, для которого предложено название *Starkeya moskoviensis* sp.nov., типовой штамм 3С<sup>T</sup> (=VKM В-3218<sup>T</sup>=KCTC 62336<sup>T</sup>) (рис. 2) .

Геном *Starkeya moskoviensis* 3С<sup>T</sup> (VMBP00000000) состоит из 4179879 п.н., 3888 генов, 3791 белок-кодирующих генов и имеет ряд отличий от генома *Starkeya novella* DSM 506<sup>T</sup>. Средняя идентичность нуклеотидов гомологичных генов (ANI) и ДНК-ДНК гомология *in silico* (dDDH) штамма 3С<sup>T</sup> и *S. novella* DSM 506<sup>T</sup> составили 85.2% и 28.3%, соответственно.

Род *Starkeya* относится к классу *Alphaproteobacteria* семейства *Xanthobacteraceae*. Представители рода *Starkeya* (валидно описаны только два вида) являются строго аэробными, грамотрицательными, факультативно - метилотрофными бактериями, играющими важную роль в деградации ряда соединений

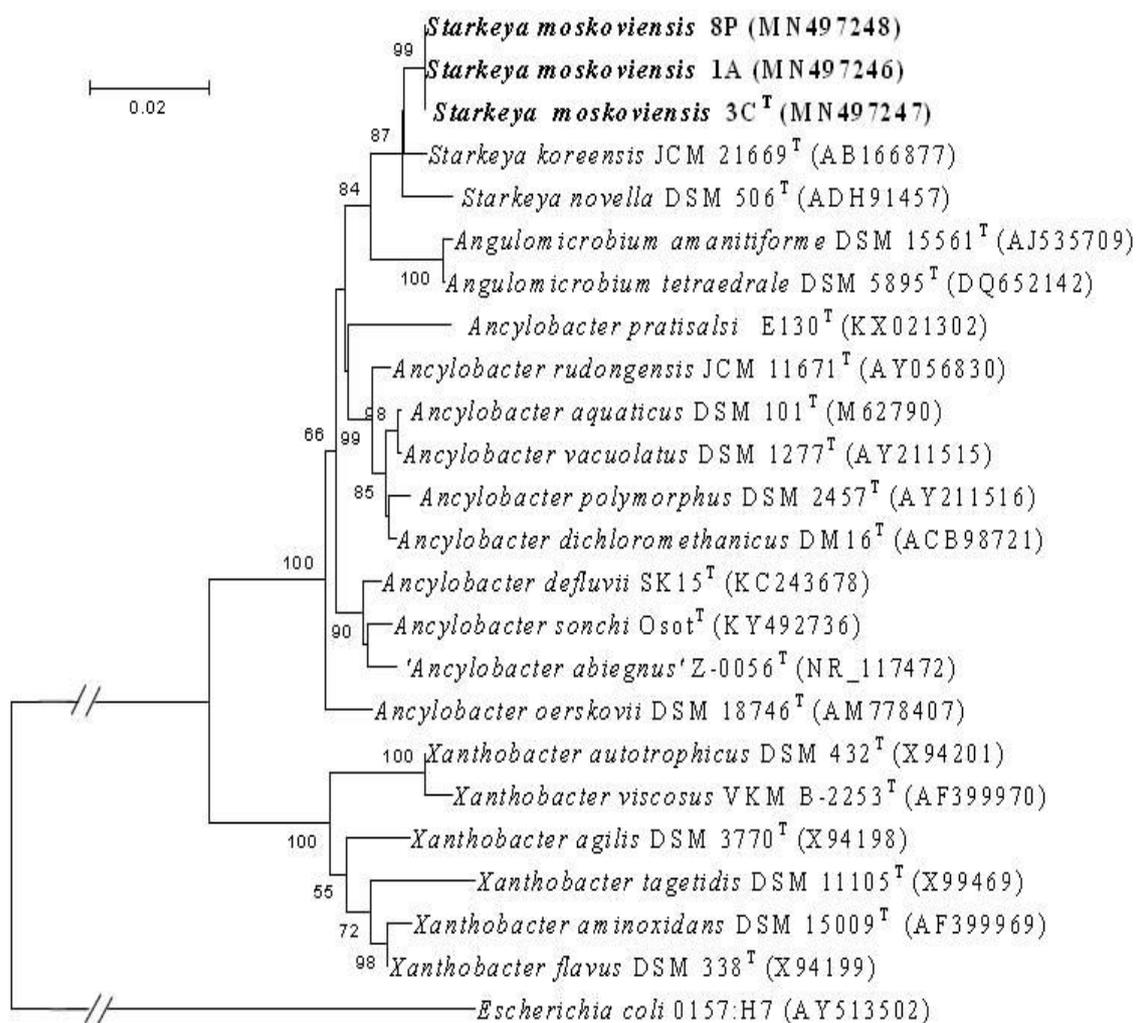


Рис. 2. Филогенетическое положение штаммов 3C<sup>T</sup>, 1A и 8P, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* 0157: H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Таким образом, род *Starkeya*, представленный до настоящего времени только двумя видами- *S. koreensis* KCTC 12212<sup>T</sup> и *S. novella* DSM 506<sup>T</sup>, пополнился новым представителем - *Starkeya moskoviensis* sp.nov.

## Бактериальная флора креветки *Neocaridina heteropoda* (Liang, 2002)

<sup>1</sup>Шорохова А.П., <sup>1</sup>Никулин Н.А., <sup>1</sup>Присяжная Н.В., <sup>1,2</sup> Зимин А. А.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
zimmin@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_50-52

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования, Пушинский государственный естественно - научный институт

**Введение.** Креветки широко распространены в природе, занимая 78% рынка морепродуктов [1]. Этой отрасли удалось вырасти благодаря значительному увеличению производства продукции аквакультуры. За счёт искусственного выращивания креветок, в

2018 году объёмы мировых предложений этого продукта увеличились на 55% [2]. То есть аквакультура способна обеспечить потребителей стабильной и надёжной поставкой продукта [3]. Разведение креветок продемонстрировало высокую продуктивность этого процесса при весьма низких его затратах. В искусственной среде обитания креветки размножались существенно быстрее, чем многие другие животные. Это указывает на большой потенциал производства этой аквакультуры. [4]. Основной проблемой коммерческого выращивания креветок являются заболевания животных, связанные с периодическими вспышками бактериальных и вирусных инфекций креветок, что ведёт к уменьшению выхода морепродукта. Здоровье животных стало серьёзной проблемой для потенциальных инвесторов, а, следовательно, и для будущего аквакультуры. Чтобы уменьшить потери в производстве из-за болезней, ряд производителей стал прибегать к более раннему сбору урожая креветок. Стали собирать раньше, чем могут произойти значительные потери от заболеваний. Это позволило производить большее количество продукта, но значительно меньшего размера. [1]. Рынок креветок продолжает расти во всем мире, индустрии аквакультуры необходимо продолжать разрабатывать новые инновационные стратегии, позволяющие использовать возможности роста рынка. В этих условиях преодоление бактериальных инфекций у креветок становится одной из основных задач новых технологий выращивания этого полезного продукта. Ракообразные представляют собой второй по величине субфилум многоклеточных животных на земле, которые обитают в различных водных средах, многие используются человеком в пищу с древнейших времен. Исследование микробиома и вириома этой группы животных выглядит весьма актуальным как с фундаментальной, так и практической точки зрения.

**Задача исследования.** Для характеристики бактериальной компоненты ЖКТ популяции неокаридин, выращиваемых в России, выявления основных мажорных симбионтов их кишечника и создания задела для последующих метагеномных исследований микрофлоры, а также проведения различных экспериментов с этим лабораторным животными необходимо было выявить максимальное бактериальное разнообразие этой среды обитания.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлась креветка *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904), синоним *N. heteropoda* (Liang, 2002), реже синоним *N. denticulata sinensis* (Kemp, 1918) [2]. Приводим полную систематику: тип – *Animalia*, подтип – *Crustacea*, класс – *Malacostraca*, отряд – *Decapoda*, подотряд – *Caridea*, семейство – *Atyidae*.

Выделение бактерий из *N. heteropoda* проводили из гомогената всей пищеварительной системы креветки. Для выделения пищеварительной системы проводили операцию, основываясь на реконструкции структуры пищеварительной системы, полученной методом компьютерной микротомографии. В чашке Петри отмывали креветку 70% этиловым спиртом от поверхностных микроорганизмов, при помощи скальпеля разрезали хитиновый экзоскелет, энтомологической булавкой извлекали необходимую область кишечника и помещали ее в чашку Петри. Добавляли 0,1 мл 0,9% NaCl на чашку, шпателем растирали пищеварительную систему до получения однородной взвеси. Взвесь суспендировали в 0,9 мл 0,9% NaCl, 0,1 мл суспензии и высевали на разные агаризованные питательные среды. Затем инкубировали культуры при 25° С, 24 часа. Из полученных накопительных культур выделяли отдельные колонии на агаризованной среде LB. Количество быстрорастущих бактерий (КОЕ/мл) определяли методом разведений суспензии содержимого кишечника креветки. Подсчёт клеток проводили на чашках Петри из разведений, которые давали рост от 30 до 150 колоний в 3-х кратной повторности. Рассев суспензии осуществляли на агаризованные среды: а) LB, б) триптон-соевую среду ИБФМ РАН (5/5), в) разведённую в 10 раз триптон-соевую среду ИБФМ РАН (5/5), г) питательную среду с аквариумной водой (ППСАВ) (г/л): дрожжевой экстракт – 1, пептон – 1, агар – 15. Определение бактерий проводили с помощью масс-спектрометрии пептидов.

**Результаты и обсуждение.** Численность популяции быстрорастущих бактерий кишечника креветки не превышала концентрации  $10^4$  КОЕ/мл. На среде LB выросло  $9.1 \pm 0.8 \times 10^4$  клонов, на среде 5/5 -  $7.7 \pm 0.9 \times 10^4$ , на среде 5/5, разведённой в 10 раз -  $8.2 \pm 0.4 \times 10^4$ , на среде ППСАВ -  $7.8 \pm 0.9 \times 10^4$ . Было выделено более 40 штаммов быстрорастущих бактерий. Изоляты были очищены из отдельных колоний путем ряда последовательных пересевов.

С помощью MALDI масс-спектрометрии пептидов длиной 2–20 кДа на приборе Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) было проведено определение бактерий. Идентификация штаммов производилась с использованием программы MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), полученные спектры сравнивались как с базой данных Bruker, так и с локальной базой данных Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН. Выборочные результаты определения приведены в таблице 1. Достоверным результатов считались значения более 1,7.

Табл. 1. Определение таксономии ряда штаммов бактерий кишечника креветки *N. heteropoda* по базе данные Bruker

Название штамма бактерий	Результат определения	Значение по БД MALDI Biotyper
Pu-ZSH-11	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.302
Pu-ZSH-3g	<i>Aeromonas veronii</i>	2.384
Pu-ZSH-4	<i>Bacillus marisflavi</i>	1.833
Pu-ZSH-5	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.129
Pu-ZSH-6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.224
Pu-ZSH-7	<i>Bacillus cereus</i>	1.904
Pu-ZSH-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	2.225
Pu-ZSH-20	<i>Aeromonas media</i>	2.056
Pu-ZSH-20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.986
Pu-ZSH-22	<i>Bacillus vietnamensis</i>	1.812
Pu-ZSH-25	<i>Shewanella putrefaciens</i>	1.781

**Заключение.** Мажорными аэробными культивируемыми компонентами бактериального сообщества кишечника креветки *N. heteropoda* являются представители родов: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Aeromonas* и *Bacillus*.

#### Литература

1. SOFIA . The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the Sustainable Development Goals. FAO; Rome, Italy: 2018.
2. Gaille B. 21 Shrimp Industry Statistics and Trends. [(accessed on 27 March 2019)];2018 Available online: Brandongaille.com.
3. Ellis A. Master's Thesis. Clemson University; Clemson, SC, USA: 2011. Evaluating the Impacts of Production Process and Product Origin on Willingness to Pay for Shrimp.
4. Greenberg P. The NOT-SO-SIMPLE Life of Shrimp. Prevention. 2012;64:68–77.

## Секция 2. Биохимия, физиология и молекулярная биология микроорганизмов

### Генотипирование природных изолятов дрожжей *Saccharomyces* для селекции новых штаммов хересных дрожжей

<sup>2</sup>Авданина Д. А., <sup>2</sup>Ширяев М. И., <sup>1</sup>Кишковская С. А., <sup>1</sup>Танащук Т. Н.,  
<sup>1</sup>Шаламитский М. Ю., <sup>2</sup>Эльдаров М. А., <sup>2</sup>Равин Н. В., <sup>2</sup>Марданов А. В.

<sup>1</sup>Всероссийский национальный научно-исследовательский институт винограда и вина «Магарач»  
РАН, г. Ялта

<sup>2</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва; d.avdanina@biengi.ac.ru

Хересные дрожжи – уникальные представители винодельческой микрофлоры, используемые в традиционных технологиях получения биологически выдержанных вин (херес, Юрское желтое вино, Самородный сухой Токай) [1].

В сравнении с бродильными штаммами *Saccharomyces* хересные дрожжи имеют отличительные характеристики. Основными из них являются способность формировать пленку на поверхности виноматериала и в этих условиях роста окислять этанол в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы. Пленкоформирующий и окислительный метаболизм являются адаптационными механизмами, которые позволяют клеткам выживать при таких условиях [2].

Хересные дрожжи представляют большой интерес для исследователей, являются объектами сравнительных геномных исследований [2-4]. Имеющиеся литературные данные о свойствах хересных дрожжей в основном получены при изучении производственных хересных популяций [5]. Однако среди нерешенных вопросов остаются вопросы происхождения хересных дрожжей: могут ли они быть найдены на винограде или их можно обнаружить только в производственных условиях, а также могут ли они являться дрожжами первичного виноделия.

*Цель работы состояла* в выделении природных штаммов дрожжей *Saccharomyces* и отборе перспективных штаммов для производства вин типа херес пленочным способом на основании исследования их молекулярно-генетических и биотехнологических свойств.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ РАБОТЫ

Объектами исследования являлись природные изоляты дрожжей, выделенные в сезоны виноделия 2016 г. и 2018 г. из проб винограда, произрастающего в виноградо-винодельческих хозяйствах разных климатических зон Республики Крым и Ростовской области. Контролем служил селекционный штамм I-329 из коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач», применяемый в производстве хереса пленочным способом.

Выделенные изоляты характеризовали классическими методами по стандартным характеристикам: описывали морфологию клеток, способ вегетативного размножения, способность к спорообразованию, морфологию аскоспор. При оценке энологических свойств (определение бродильной способности штаммов, образование сероводорода и пленкообразование, массовая концентрация летучих кислот и альдегидов, содержание остаточных сахаров и этилового спирта) использованы подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия.

Выделение препаратов ДНК из клеток дрожжей для ПЦР-анализа проводили по методике описанной ранее [6].

Генотипирование штаммов. Для отнесения штаммов к отдельным расам «винных» и

«хересных» дрожжей, идентификации «французских» и «испанских» штаммов использовали ПДРФ анализ ПЦР-фрагментов участков повтора рДНК, включающего два «внутренних транскрибируемых спейсера» ITS1 и ITS2 и ген 5,8 рРНК и секвенирование по методу Сенгера на ABI 3730.

Штаммы, несущие «полноразмерный» и «укороченный» (делеция размером 111 пн) варианты промотора гена *FLO11* выявляли методом ПЦР-анализа, регистрировали образование фрагментов размером около 400 пн или 300 пн, характерных для этих двух аллелей гена *FLO11*, «хересного» и «винного», соответственно.

Для выявления штаммов с полиморфными вариантами гена *YKL218c* также использовали ПДРФ-анализ. ПЦР-фрагменты, полученные со специфическими праймерами, обрабатывали рестриктазой *AflIII*. Для «хересных» аллелей наблюдали образование фрагментов 450 пн и 350 пн. У «винных» аллелей размер фрагмента оставался неизменным.

### **Результаты и обсуждение.**

Генотипирование штаммов на основании анализа участка межгенного спейсера рДНК подтвердило принадлежность к виду *S.cerevisiae* для 96 штаммов из 102 отобранных штаммов. Среди оставшихся 6 штаммов по данным секвенирования ITS последовательностей были отнесены к видам *Starmerella bacillaris*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*. Данные виды часто встречаются в природе на поверхности ягод винограда [7]. Таким образом, в результате была сформирована рабочая коллекция из 96 штаммов дрожжей *S.cerevisiae*.

По данным анализа ITS локуса 82 штамма имел последовательность, характерную для «винных» штаммов, а 14 для «хересных» французских, причём «испанских хересных» штаммов среди анализируемых обнаружено не было.

Для ряда «хересных» штаммов характерна делеция размером 111 п.н. в положении от [-1313] до [-1203] промотора гена адгезина *FLO11*, приводящая к усилению его экспрессии [8]. Согласно полученным данным такая делеция присутствовала у 4 штаммов, 7 штаммов были гетерозиготными.

Специфические для хересных дрожжей аллели гена *YKL281C* были выявлены у 17 штаммов, 3 штамма были гетерозиготными.

Пять штаммов оказались «положительными» по всем трем маркерам и могут являться перспективными для дальнейшей селекционной работы. Результаты представлены в таблице 1.

Для уточнения выбора перспективных для производства вин типа херес штаммов дрожжей-сахаромицетов проведен сравнительный анализ результатов молекулярно-генетических исследований и биотехнологических свойств для 28 штаммов, имеющих «хересные» аллели.

По результатам сравнительной оценки генетических и энологических свойств отобрано 6 штаммов, характеризующиеся высокой пленкообразующей и альдегидообразующей способностями.

Табл. 1 – Генотипирование штаммов

Количество штаммов	Its	FLO11	YKL218c
68	W	W	W
1	W	F/W	W
2	W	F	W
5	W	W	F
3	W	W	F/W
1	W	F	F
2	W	F/W	F
5	F	W	W
4	F	W	F
1	F	F	F
4	F	F/W	F

\* W – «винный аллель», F – «хересный» аллель.

Представленный методический подход к отбору природных изолятов дрожжей *S.cerevisiae* может способствовать разработке стратегий селекции новых штаммов хересных дрожжей и совершенствования технологии производства вин типа Херес.

#### Литература

1. Alexandre H. // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 167. № 2. P. 269.
2. Legras J.-L. et al. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 503.
3. Eldarov et al. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 965.
4. Legras et al. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 7. P. 1712.
5. Charpentier et al. // Antonie van Leeuwenhoek. V. 95. № 3. P. 263.
6. Кишковская и соавт. // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 3. P. 323.
7. König et al. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. // Springer Science & Business Media. 2009. 522 p.
8. Fidalgo et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. V. 103. № 30. P. 11228

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-16-00109.*

### Геномная характеристика метилотрофа '*Hansschlegelia quercus*' Dub как фитосимбионта

*Агафонова Н.В., Капаруллина Е. Н., Доронина Н. В.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; nadyagafonova@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_55-57

Аэробные метилотрофные бактерии – одна из функционально важных групп микроорганизмов. Метилотрофы являются фитосимбионтами, поскольку используют метанол и другие окисленные и замещенные производные метана (естественные продукты

метаболизма растений) в качестве источников углерода и энергии, и, в свою очередь, синтезируют вещества, стимулирующие рост и развитие растений (Агафонова и др., 2013; Доронина и др., 2015; Агафонова и др., 2016). Недавно из почек дуба (*Quercus robur* L.) нами выделен новый представитель рода *Hansschlegelia* – '*Hansschlegelia quercus*' Dub (= VKM В-3284 = CCUG 73648 = JCM 33463). Для определения биотехнологического потенциала исследуемого штамма в данной работе мы проанализировали его геном (номер проекта SIUB00000000.1 в DDBJ/ENA/GenBank) на наличие некоторых метаболитов и ферментов, участвующих в фитосимбиозе.

Фитогормоны ауксины – регуляторы роста и развития растений, активируют рост, корнеобразование, формирование проводящих тканей. Известно два основных пути биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты – самого распространенного природного ауксина – триптофан-зависимый путь и триптофан-независимый. Гены, кодирующие ключевые ферменты вариантов триптофан-зависимого пути: триптофан-2-монооксигеназы (*iaaM*), индолилпируватдекарбоксилазы (*ipdC*), триптофандекарбоксилазы, в геноме '*H. quercus*' Dub не были обнаружены. Следовательно, наиболее вероятным путем синтеза индолов у исследуемого штамма является триптофан-независимый, поскольку найдены гены ключевых ферментов этого пути: антранилатсинтазы (*trpE*, EYR15\_16820), антранилатфосфорибозилтрансферазы (*trpD*, EYR15\_16815), индол-3-глицерофосфатсинтазы (*trpC*, EYR15\_16810), триптофансинтазы  $\alpha$  и  $\beta$  (*trpA*, EYR15\_09625 и *trpB*, EYR15\_09630).

Другой класс фитогормонов – цитокинины – стимулируют рост и деление клеток, улучшают процессы фотосинтеза растений. Эти гормоны могут синтезироваться двумя путями: *de novo*, посредством изопентинилтрансфераз, катализирующих образование изопентениладенозин-монофосфата из АМФ и диметилаллилпирофосфата или путем изопентилирования аденинового основания, прикрепленного к антикодону петле некоторых тРНК, с помощью фермента тРНК-изопентинилтрансферазы (тРНК-ИПТ). Наличие в геноме '*H. quercus*' Dub гена *miaA* (EYR15\_01900), кодирующего тРНК-ИПТ, указывает на возможность синтеза цитокининов вторым путем.

Высшие растения зависят от внешних источников витамина В<sub>12</sub>. Обнаружено, что '*H. quercus*' Dub способен к образованию витамина В<sub>12</sub>, или кобаламина, который участвует в реакциях изомеризации и трансметилирования у растений. В геноме мезофита содержатся кластеры генов *cobJHG* (EYR15\_05475 - 05490), *cobMLKA* (EYR15\_05530 - 05545), *cobUWNOD* (EYR15\_05905 - 05930), *cobST* (EYR15\_12025 - 12030), вовлеченные в биосинтез витамина В<sub>12</sub>.

Вместе с тем, согласно геномным данным, исследуемый штамм обладает фосфатсольбилизирующей активностью, поскольку найдены гены синтеза экзополифосфатазы (EYR15\_05300), неорганической дифосфатазы (EYR15\_08335), пирофосфатазы (EYR15\_02470), кислой фосфатазы (EYR15\_14065) и *phn* оперон (*phnCDEEFGHIJKLMN*, EYR15\_12800 - 12860), кодирующий С-Р-лиазный комплекс, известный широким спектром разлагаемых фосфонатов.

В результате геномного анализа у '*H. quercus*' Dub не обнаружены гены синтеза дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (*acdS*), снижающей концентрацию этилена (гормона старения растений), и D-цистеиндисульфогидразы (*dcyD*), предположительно участвующей в формировании ассоциации бактерий с растениями. Однако наличие в геноме гена синтеза 4-гидроксibenзоата полипренилтрансферазы (*ubiA*, EYR15\_02360), предшественник которого (4-гидроксibenзоат) имеет антимикробную активность, отражает возможность конкурентной колонизации исследуемым мезофитом поверхности растений.

Выявлена способность штамма '*H. quercus*' Dub накапливать полигидроксибутират (ПГБ) в качестве внутриклеточного запасного источника углерода и энергии,

расходуемого при неблагоприятных условиях, поскольку обнаружены гены, катализирующие реакции биосинтеза ПГБ: *phaA* и *phaB* (EYR15\_14455 - 14460), регуляторный белок PhaR (EYR15\_14470) и поли-3-гидроксиалканоатсинтазу (*phaC*, EYR15\_04745). Кроме того, известно, что мономер ПГБ – оксибутират является химическим шапероном, универсальным биопротектором, который важен как для самих бактерий, так и для колонизируемых ими растений.

Таким образом, в результате проведенного анализа генома показано, что метилотроф '*Hansschlegelia quercus*' Dub способен стимулировать рост растений, благодаря синтезу фитогормонов, витамина B<sub>12</sub> и повышению биодоступности фосфора в почве, оказывать конкурентное воздействие на другие микроорганизмы при колонизации растений, переживать неблагоприятные условия среды за счет накопления ПГБ. Выявленные механизмы жизненно необходимы при фитосимбиозе метилотрофа с высшими растениями, откуда исследуемый штамм был выделен. Подобная молекулярно-генетическая характеристика позволяет не только определить возможные механизмы положительного влияния бактерий на рост растений и их симбиотическую связь, но и использовать эти данные для создания штаммов с улучшенными свойствами при производстве эффективных препаратов стимуляторов роста растений.

#### Литература

1. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.. Фосфатсольбилизирующая активность аэробных метиловых бактерий // Микробиология. 2014. Т. 83. № 1. С. 28–32.
2. Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. Аэробные метиловых бактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 2. С. 111-121.
3. Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.. Повышение устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метиловыми бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 210–216.

### **Сравнительная характеристика полифосфатаз *Saccharomyces cerevisiae* из штаммов-суперпродуцентов**

<sup>1</sup>Андреева Н.А., <sup>1</sup>Ледова Л.А., <sup>1</sup>Рязанова Л.П., <sup>1</sup>Томашевский А.А., <sup>1</sup>Кулаковская Т.В.,  
<sup>2</sup>Эльдаров М.Э.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
alla@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_57-58

<sup>2</sup>ФИЦ «Биотехнология РАН» Институт биоинженерии РАН

Катаболизм неорганических полифосфатов у дрожжей обеспечивается несколькими полифосфатазами: Ppx1, Ppn1, Ddp1 и Ppn2. Для изучения свойств и функций этих ферментов были сконструированы штаммы *Saccharomyces cerevisiae* - суперпродуценты этих полифосфатаз. Эти штаммы использовали для получения препаратов очищенных ферментов. Ферменты различаются по наличию эндо – и/ или экзополифосфатазной активности, стимулирующему эффекту двухвалентных катионов, чувствительности к известному ингибитору полифосфатаз, гепарину, и способности гидролизовать полифосфаты разной длины и другие субстраты с фосфоэфирной связью. Различная локализация в клетке и

особенности физико-химических свойств предполагают функциональные различия этих важнейших компонентов системы гомеостаза фосфора у дрожжей.

Свойства полифосфатаз *Saccharomyces cerevisiae*

Ген	Структура фермента	Семейство	Эндополифосфатазная активность	Экзопполифосфатазная активность, мЕ/мг	Стимуляция двухвалентными катионами	Гепарин, I <sub>50</sub> (мг/мл)	Низкомолекулярные субстраты
<i>PPN 1</i>	Гомотетрамер  субъединицы 33-35 кД	PPN1 семейство	+	500	Co <sup>2+</sup> >Zn <sup>2+</sup> >>Mg <sup>2+</sup>	0.001	дАТФ АТФ Гуанозин-тетрафосфат
<i>PPX 1</i>	Мономер, 45 кД	ДНН семейство фосфоэстераз	-	240	Co <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup> >>Zn <sup>2+</sup>	0.05	Гуанозин-тетрафосфат цАМФ
<i>PPN 2</i>	Мономер, 37 кД	PPP-суперсемейство металлофосфатаз	+	0,1	Co <sup>2+</sup> =Zn <sup>2+</sup> >>Mg <sup>2+</sup>	>0.25	Не известны
<i>DDP 1</i>	Мономер, 21 кД	Семейство Nudix гидролаз	+	0,05	Co <sup>2+</sup> =Zn <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup>	>0.25	Диаденозин-тетрафосфат Фосфоинозитол пирофосфат

### Очистка и характеристика кислой фосфатазы Pho5 *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>1</sup>Андреева Н.А., <sup>1</sup>Ледова Л.А., <sup>1</sup>Рязанова Л.П., <sup>1</sup>Кулаковская Т.В., <sup>2</sup>Эльдаров М.Э.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
alla@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_58-59

<sup>2</sup>ФИЦ «Биотехнология РАН», Институт биоинженерии РАН

Кислые фосфатазы у дрожжей *S. cerevisiae* являются частью системы фосфорного гомеостаза. Известно несколько высокоомологичных кислых фосфатаз дрожжей, среди которых отдельный интерес представляет собой репрессибельный фермент Pho5 в связи с его локализацией в клеточной стенке. По физико-химическим свойствам кислые фосфатазы

дрожжей сходны, поэтому для получения очищенного фермента и его характеристики был сконструирован штамм-сверхпродуцент Pho5. Родительский штамм трансформировали вектором, содержащем ген *PHO5* под сильным конститутивным промотором дрожжевой глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Активность кислой фосфатазы штамма-трансформанта, ассоциированная с клеточной стенкой и находящаяся в культуральной жидкости, превышала таковую у родительского штамма в 10 и 20 раз, соответственно. Эта активность распределялась между культуральной жидкостью и биомассой примерно поровну. Из культуральной жидкости штамма-суперпродуцента получен очищенный препарат Pho5 с удельной активностью 46 Е/мг белка и выходом 95 Е/л. Очищенный препарат проявлял сходную активность со многими органическими субстратами, содержащими фосфоэфирную связь, однако очень слабо гидролизовал неорганические полифосфаты. Следовательно, эта кислая фосфатаза не участвует в метаболизме полифосфатов в клеточной стенке, а ее функцией является высвобождение фосфата из органических соединений в условиях дефицита фосфата в среде, когда происходит индукция этого фермента.

Субстратная специфичность очищенной Pho5 из *S. cerevisiae* (100% - 45.8 Е/мг белка)

Субстрат	Концентрация, мМ	Удельная активность, %	Km, мМ
<i>p</i> -нитрофенилфосфат	2,7	100	1,00±0,05
АТФ	2,5	73	0,75±0,04
Глюкозо-6-фосфат	2,5	73	0,40±0,07
Пирофосфат	2,5	43	0,52±0,06
АДФ	2,5	66	
ГТФ	1,25	53	
НАДФ	1,25	13	
Фруктозо-1,6-дифосфат	2,5	17	
Рибозо-5-фосфат	1,25	27	
Фосфоенолпируват	2,5	11	
Глицерофосфат	2,5	63	
Триполифосфат	2,5	5	
ПолиР <sub>15</sub>	2,5	4	
ПолиР <sub>208</sub>	2,5	1	

## Ингибирование гемолитической активности экзотоксинов *B. cereus*

<sup>1</sup>Андреева-Ковалевская Ж.И., <sup>2</sup>Чулин А.Н., <sup>1</sup>Нагель А.С., <sup>1</sup>Сиунов А.В., <sup>1</sup>Солонин А.С.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино;  
hemolysin6@gmail.com; DOI: 10.18334/ibpm2019\_60-61

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, г. Пушкино; pepsylab@bibch.ru

Цитолитические пороформирующие токсины, продуцируемые микроорганизмами внутри организма хозяина, являются основными факторами патогенности и играют главенствующую роль в развитие заболеваний. *B. cereus* продуцирует целый ряд гемолизинов: сфингомиелиназу и цереолизин АВ, цереолизин или гемолизин I, гемолизин BL, гемолизин III, токсин CytK (гемолизин IV), гемолизина II и цереолизинподобный гемолизин. Один из цитолитических порообразующих токсинов *Bacillus cereus* – гемолизин II (НлуII) представляет особый интерес, так как он широко распространен среди бацилл цереусной группы. Ген гемолизина II обнаружен не только в *B. cereus*, который может вызывать диаррейный и эметический синдромы, а также заболевания глаз, маститы и другие болезни, но и в клетках *B. thuringiensis*, являющимся патогенным для насекомых и использующимся для производства инсектицидных препаратов, и в клетках *B. anthracis*, чьи отёчный и летальный токсины участвуют в развитие инфекционного процесса сибирской язвы. Гемолизин II продуцируется бактерией в окружающую среду в форме мономера и, взаимодействуя с клеточными мембранами, олигомеризуется с образованием открытых трансмембранных структур – нанопор, что приводит в итоге к лизису клетки. При заражении макроорганизма бактерией, продуцирующей гемолизин II, может происходить лизис множества клеток, что приводит к нарушению функционирования атакуемых органов и гибели организма хозяина. Таким образом, цитолитическое патогенное действие НлуII на разные клетки и макроорганизмы обусловлено образованием ионпроводящих каналов в клеточных мембранах. В настоящее время отсутствуют эффективные пути защиты организма от действия гемолизинов *Bacillus cereus*. Мы провели поиск веществ-ингибиторов (блокаторов) действия уже секретированного токсина в организм хозяина, чтобы нейтрализовать действие гемолизина II и других токсинов. Нами были отобраны вещества, с разной эффективностью нейтрализующие действие пороформирующего токсина гемолизина II и подобных ему токсинов, оказываемое на эритроциты человека, - это циклодекстрины и низкомолекулярные вещества. В последние годы пристальное внимание исследователей направлено на поиск и использование низкомолекулярных соединений в качестве антимикробных препаратов. Показано, что некоторые производные 1,2,3-триазола проявляют антимикробную и противовирусную активность. Нами было установлено, что 1,2,3-бензотриазол и его производные подавляют действие порообразующих токсинов. Производные 1,2,3-бензотриазола ингибируют гемолиз эритроцитов, вызванный действием гемолизина II, с разной эффективностью. Максимально ингибирует гемолиз 1-гидрокси-7-азобензотриазол до 100% при выраженном концентрационном эффекте. При малых концентрациях НлуII происходит полное подавление гемолиза, а при высоких концентрациях - в 10 раз. 1,2,3-Бензотриазол и 1-гидрокси-бензотриазол хуже ингибировали гемолиз. 1-гидрокси-7-азобензотриазол в основном действует на белок. По-видимому, триазольный фрагмент молекулы 1,2,3-бензотриазола взаимодействует с мембранами эритроцитарных клеток и с самой молекулой токсина, образуя относительно устойчивые комплексы, которые предотвращают пороформирование. Сходный по структуре бензимидазол так же, как и 8-

гидроксихинолин не проявляют антигемолитического эффекта. Кроме того, было установлено, что 1,2,3-бензотриазол гораздо слабее блокирует действие гемолизина II на эритроцитарные клетки, чем 1-гидрокси-бензотриазол и 1-гидрокси-7-азобензотриазол, что, по-видимому, объясняется более высокой устойчивостью образующихся комплексов этих соединений с белками. 1-Гидрокси-7-азобензотриазол проявляет высокий антигемолитический эффект, по сравнению с 1-гидрокси-бензотриазолом, что, по-видимому, объясняется способностью данного соединения взаимодействовать с аминокислотными группами белков [1] и образовывать более устойчивые комплексы. 1-Гидрокси-7-азобензотриазол оказывает ингибирующее действие на токсины продуцируемые *B.cereus* в культуральную среду, что может указывать на его неспецифическое воздействие на белки. Ингибирующий эффект был подтвержден в экспериментах *in vivo*. Диаметр гептамерной поры гемолизина II составляет около 2 нм при входе в пору и от 1 нм до 1.6 нм вдоль остального стебля. Известно, что ряд низкомолекулярных соединений, также как и производные циклодекстрина, блокируют поры образованные токсинами, вызывая ингибирование гемолизина эритроцитов за счет заполнения внутреннего пространства пор [2]. Можно предположить, что подобными свойствами обладают исследуемые производные 1,2,3-бензотриазола. В ходе этой работы подобраны вещества способные с разной эффективностью нейтрализовать действие пороформирующего токсина гемолизина II и подобных ему токсинов.

#### Литература

1. Carpino, L. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *JACS*. 1993, 115(10): 4397. doi: 10.1021/ja00063a082
2. Nestorovich E.M and Bezrukov S.M. Obstructing Toxin Pathways by Targeted Pore Blockage. *Chem. Rev.* 2012, 112, 6388. dx.doi.org/10.1021/cr300141q

### **Биохимические свойства НАДФ<sup>+</sup>-зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z**

<sup>1,2</sup> Андриянов П.А., <sup>1</sup> Мустахимов И.И.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, DOI: 10.18334/ibpm2019\_61-62

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт; pas1816@yandex.ru

Метанотрофы – физиологическая группа аэробных бактерий, использующих метан и метанол в качестве источников углерода и энергии. Особенностью углеводного метаболизма галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z является функционирование одновременно нескольких путей распада фосфосахаров – пирофосфат-зависимого гликолиза, фосфорилирующего и полуфосфорилирующего вариантов пути Энтнера-Дудорова, фосфокетотазного пути и окислительного пентозофосфатного цикла. Одной из ключевых реакций пути Энтнера-Дудорова и пентозофосфатного цикла является окисление глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконата глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ) с восстановлением НАДФ(Ф)<sup>+</sup>. В геноме *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z обнаружено две изоформы Г6ФДГ с идентичностью аминокислотных последовательностей 38,3%. Цель данной работы заключалась в биохимической характеристике НАДФ<sup>+</sup>-зависимой Г6ФДГ.

Идентифицированная открытая рамка считывания 1491 п.о., предположительно кодирующая ген НАДФ<sup>+</sup>-зависимой Г6ФДГ, была амплифицирована из геномной ДНК *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. ПЦР-фрагмент клонировали в экспрессионный вектор рЕТ-30а, предназначенный для синтеза белка с навеской из 6 гистидинов на С-конце. Полученной плазмидой рЕТ-30а-Г6ФДГ трансформировали клетки *Escherichia coli* Rosetta (DE3), синтез белка индуцировали добавлением 0,5 мМ изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозида в логарифмической фазе роста культуры. Гомогенный препарат белка был получен с использованием аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Молекулярная масса субъединицы, определенная с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, соответствовала теоретически рассчитанной (57 кДа). С использованием гель-фильтрации была определена нативная м. м. фермента ~300 кДа, что указывает на гексамерную форму энзима.

Рекомбинантная Г6ФДГ активна в диапазоне рН 7,5 - 10,5 с оптимумом рН 10. Фермент проявлял активность в температурном диапазоне 20 – 45 °С, с максимумом при 38 °С. Активность фермента снижалась на 50% при температуре измерения 45 °С, при 50 °С фермент полностью терял свою активность. Активность фермента зависела от ионов Mg<sup>2+</sup>, при добавлении 1 мМ Sn<sup>2+</sup> или Ba<sup>2+</sup> активность возрастала в 2,61 и 1,7 раз, соответственно. 1 мМ Ni<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup> ингибировали фермент соответственно в 2,7 и 2,04 раза.

Анализ влияния метаболитов на активность Г6ФДГ показал, что в присутствии оксалоацетата активность фермента увеличивалась в 3,55 раз, в присутствии малата и фруктозо-6-фосфата - в 2,35 и 2 раза, соответственно. Фосфоенолпируват, пируват, глюкозо-1-фосфат и α-кетоглутарат не оказывали существенного эффекта на Г6ФДГ. Г6ФДГ подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен ( $K_m$  для глюкозо-6-фосфата составила 2,09 мМ;  $K_m$  для НАДФ 0,95 мМ). Максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) составила 9,56 Е/мг белка.

*Работа поддержана РФФИ №18-04-00728а.*

## **Сравнительно-геномный анализ запрограммированного сдвига рамки считывания в гене *chlD* у прокариот**

*Антонов И.В.*

ФИЦ «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Биоинженерии, г. Москва;  
vanya.antonov@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_62-64

В случае мутаций типа вставка или делеция (длиной не кратной трем) в кодирующей области гена нарушается порядок чтения кодонов (т.е. происходит сдвиг рамки считывания или frameshift), что как правило приводит к преждевременной терминации трансляции. Мутации такого типа часто приводят к тому, что синтезируемый укороченный пептид уже не способен выполнять функцию целого белка. Из-за этого на соответствующий ген с мутацией перестает действовать отбор, и он постепенно превращается псевдоген. Однако, известны гены, у которых рядом с мутацией, сбивающей рамку считывания, находится встроенный сигнал, который корректирует ритм работы рибосомы таким образом, что мутация в гене корректируется, и происходит синтез полноценного белка. Данный механизм называется «запрограммированным сдвигом рамки считывания» (ПСРС). Наиболее распространенные сигналы ПСРС функционируют таким образом, что рибосома либо пропускает один нуклеотид (+1 ПСРС), либо читает один нуклеотид дважды (-1 ПСРС). Следует отметить, что подтвержденные функциональные сигналы ПСРС чаще всего встречается в вирусных генах или их

производных (например, мобильных элементах) [1]. В настоящее время известно лишь несколько истинных прокариотических генов, использующих ПСРС для трансляции. К ним относятся такие известные гены как *prfB*, *dnaX* и *copA*. Важно отметить, что функционирование сигнала ПСРС происходит стохастически, т.е. только часть рибосом, читающих мРНК, изменяют свою рамку чтения в ответ на сигнал. Благодаря этому гены *dnaX* и *copA* (а также вирусный ген *gag-pol*) способны производить два функциональных белка с одной мРНК, т.к. и более длинный и более короткий продукты имеют свою собственную функцию. Это в свою очередь приводит к тому, что сигнал ПСРС закрепляется в эволюции в соответствующих генах и появляется возможность детектировать и исследовать его методами сравнительной геномики.

В 2013 году нами были предсказаны и экспериментально подтверждены ранее неизвестные консервативные сигналы ПСРС в четырех семействах прокариотических генов [2]. В частности ПСРС в гене *chlD*, кодирующем среднюю субъединицу магний-хелатазы (фермента, участвующего в синтезе хлорофилла и бактериохлорофилла), показал наибольшую эффективность (до 60%). Следует отметить, что магний-хелатаза состоит из трех субъединиц: I (~350 а.к.), D (~650 а.к.) and H (~1300 а.к.), которые, как правило, закодированы в генах *chlI*, *chlD* и *chlH*, соответственно. В данной работе был осуществлен детальный сравнительно-геномный анализ генов *chlD*, содержащих ПСРС сигналы. Было показано, что данный ген присутствует в более чем 1200 прокариотических геномах из базы данных RefSeq. Неожиданно оказалось, что существенная часть этих организмов не являются фотосинтетиками. При этом более 60% найденных прокариот были способны синтезировать кобаламин (витамин B12). При этом кобальт-хелатаза CobNST, которая является одним из примерно 25 ферментов, необходимых для аэробного биосинтеза кобаламина (витамина B12) у прокариот, имеет высокое сходство с магний-хелатазой. Большая, средняя и малая субъединицы кобальт-хелатазы кодируются генами *cobN*, *cobT* и *cobS* соответственно. В одной из предыдущих работ было отмечено, что ряд прокариотических геномов, синтезирующих кобаламин, содержат гены *chlD* и *chlI*, в то время как гены *cobT* и *cobS* отсутствуют. Исходя из этого авторы того исследования предположили, что продукты генов *chlD* и *chlI* могут заменить отсутствующие субъединицы фермента *cobNST* [3].

В настоящем исследовании мы заметили, что во многих геномах, содержащих ген *chlD* с ПСРС, *отсутствует* ген *chlI* (в то время как ген большой субъединицы кобальт-хелатазы *cobN* всегда присутствует). Учитывая высокое сходство между белком *ChlI* и N-концевой частью белка *ChlD*, мы предположили, что трансляционный сдвиг рамки может позволить мРНК *chlD* продуцировать две субъединицы кобальт-хелатазы. Действительно, проведенный филогенетический анализ выявил статистически значимую корреляцию между наличием сигнала ПСРС в гене *chlD* и отсутствием отдельного гена *chlI* в геноме. В частности, ген *chlI* отсутствует в геноме таких патогенных бактерий как *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia brasiliensis*, синтезирующих кобаламин, в то время как соответствующие гены *chlD* содержат сигнал ПСРС (Рис.1). Таким образом, такие гены могут иметь потенциал для образования недостающей малой субъединицы хелатазы посредством преждевременного прекращения трансляции *chlD*.

В данной работе мы описали еще один случай, когда запрограммированный сдвиг рамки позволяет мРНК продуцировать два разных белка. Особенно интересно, что данный механизм был обнаружен в прокариотическом, а не вирусном гене, и является очень консервативным, т.к. может быть обнаружен как у архей, так и у бактерий. В связи с этим мы считаем, что дальнейшие исследования данного феномена могут пролить новый свет на раннюю эволюцию путей биосинтеза хлорофилла и / или кобаламина.

Мы хотели бы поблагодарить Павла Баранова и Марка Бородавского за важный вклад в первоначальное открытие ПСРС в гене *chlD*.

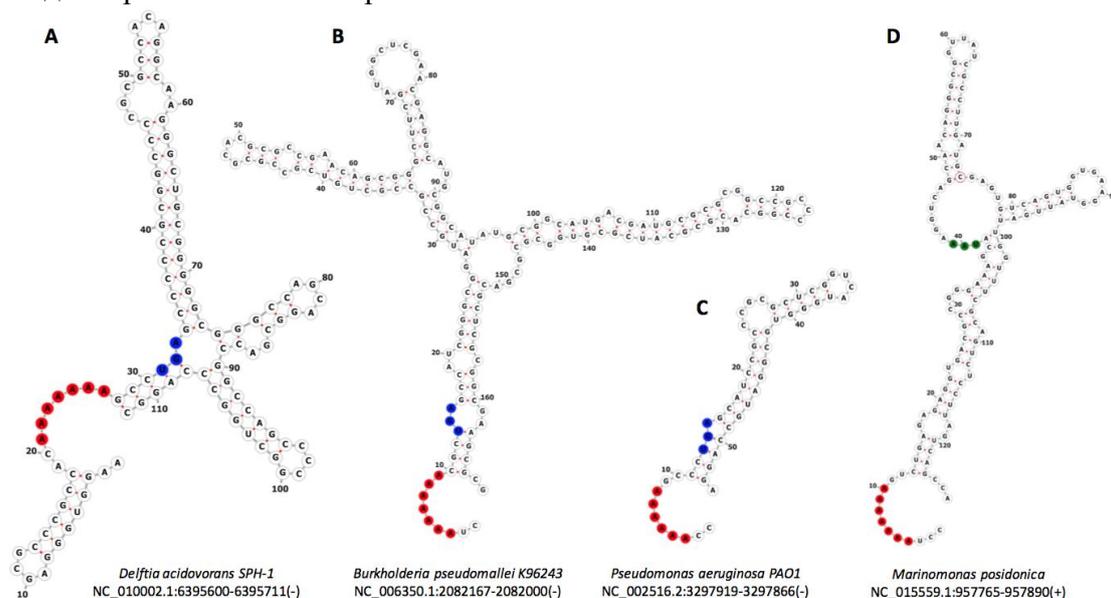


Рис. 1. Предсказанные -1 ПСРС сигналы в генах *chlD* из (A) *Delftia acidovorans*, (B) *Burkholderia pseudomallei*, (C) *Pseudomonas aeruginosa* и (D) *Marinomonas posidonica*. Первый нуклеотид в каждой последовательности соответствует положению первого кодона в исходной рамке считывания. Предполагаемые скользкие поли-А участки отмечены красным цветом. Важно отметить, что последовательности *D. acidovorans* и *P. aeruginosa* содержат мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания при обычной трансляции из-за наличия преждевременного стоп-кодона (отмечен синим цветом). Напротив, ген *M. posidonica* не имеет мутации на уровне ДНК, и его нормальная трансляция продуцирует среднюю субъединицу хелатазы, тогда как трансляция с ПСРС приводит к синтезу укороченного продукта (стоп-кодон в -1 альтернативной рамке отмечен зеленым цветом).

#### Литература

1. Atkins, John F., et al. "Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: from genetic steganography and cryptography to adventitious use." *Nucleic acids research* 44.15 (2016): 7007-7078.
2. Antonov, Ivan, et al. "Identification of the nature of reading frame transitions observed in prokaryotic genomes." *Nucleic acids research* 41.13 (2013): 6514-6530.
3. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17;278(42):41148-59.

*Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00589.*

### Аккумуляция кремния как ответ дрожжей *Yarrowia lipolytica* на стрессовые воздействия

*Аринбасарова А.Ю., Мачулин А.В., Бирюкова Е.Н., Сорокин В.В., Меденцев А.Г., Сузина Н.Е.*

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
aarin@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_64-66

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Способность к существованию в экстремальных условиях связана с высокими адаптационными возможностями микроорганизмов, «запускающими» механизмы, обеспечивающие им выживание и конкурентоспособность в различных стрессовых условиях, в том числе при действии оксидантов, температуры и др.

Механизмы адаптации представляют большой интерес для исследователей как в отношении роли этих механизмов в эволюционных процессах, так и при реализации биосинтетических возможностей клетки.

Ранее было показано, что стресс-реакции дрожжей *Yarrowia lipolytica* проявляются как изменения энергетического и антиоксидантного статусов клетки [1]. Кроме того, адаптация к различным стрессовым воздействиям включает также дополнительные «специализированные» реакции, такие как реструктуризация и появление новых клеточных ультраструктур, таких как мембранные везикулы, каналы, многослойная плазмалемма, полифосфатные гранулы, а также глобулярные структуры на поверхности клеточной стенки.

Цель работы - показать аккумуляцию кремния как одну из реакций дрожжей *Yarrowia lipolytica* на стрессовые воздействия и в связи с изменением ультраструктурной организации клеточной оболочки.

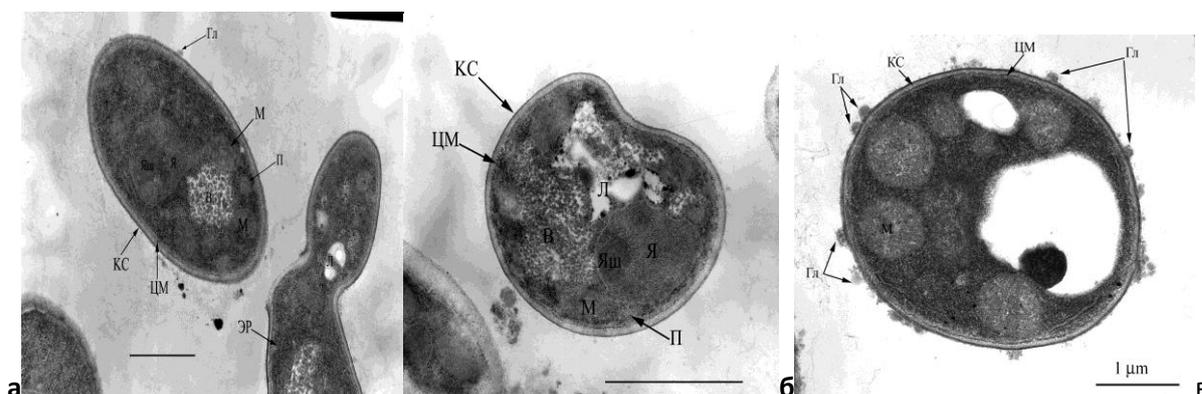


Рис. 1. Ультратонкий срез клеток *Y. lipolytica* [1].

**а** - экспоненциальная фаза роста (контроль); **б** - стационарная фаза роста; **в** - условия окислительного стресса. Длина масштабной метки 1 мкм.

Я - ядро, Яш - ядрышко, Кс - клеточная стенка, Цм - цитоплазматическая мембрана, Л - лизосома, Эр - эндоплазматический ретикулум, М - митохондрия, П - пероксисома, В - вакуоль, Лп - липиды, Пп - полифосфаты, Гл - глобулярные структуры.

Присутствие элемента кремния в глобулярных структурах показано с помощью метода рентгеновского микроанализа. Помимо кремния в глобулах был обнаружен кислород, при этом никаких других элементов обнаружено не было. Это позволяет предположить наличие кремния в виде оксида или кремниевой кислоты.

Рентгеновский микроанализ элементного состава тонких срезов клеток проводили без дополнительного контрастирования с помощью электронного микроскопа JEM-100СХII (JEOL, Япония), снабженного сканирующей приставкой EM-ASID4D и рентгеновским микроанализатором LINK-860 с детектором E5423 (Link-System, Англия) при увеличении 20 тыс. и напряжении 60 кэВ.

Одинаковые результаты были получены в условиях окислительного (экзогенного или эндогенного), теплового или холодного стрессов.

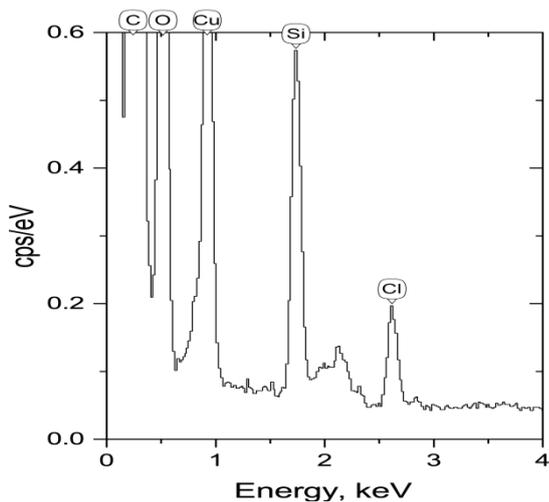


Рис. 2. Рентгеновский спектр глобулы на поверхности *Y. lipolytica*.

По литературным данным [2,3] в природе минерализация кремния была продемонстрирована для морских организмов и, как правило, при высоких концентрациях этого элемента в окружающей среде. Накопление кремния в стрессовых условиях было показано в качестве защитной реакции для растений [4]. Ассимиляция кремния была обнаружена у бактерий *Proteus mirabilis mirabilis*: кремний образовывал комплексы с белками клеточной стенки посредством связи Si–O–C. В текущей литературе не описана аккумуляция кремния в качестве стресс-реакции у дрожжей.

Для дрожжей *Y. lipolytica* было показано поглощение различных веществ, например, тяжелых металлов, что, в частности, вносит свой вклад в их индустриальный потенциал [5].

В настоящей работе мы впервые показали аккумуляцию кремния дрожжами *Y. lipolytica*. Аккумуляция кремния имеет место в стрессовых условиях и связана с образованием глобулярных структур. Образование глобулярных структур, содержащих кремний, происходит одновременно с другими изменениями ультраструктуры, в частности, модификациями клеточной оболочки, которая играет особую роль в сохранении формы и целостности клетки [6].

Изучение особенностей аккумуляции кремния дрожжами и его взаимосвязи с другими процессами в клетке является предметом дальнейших исследований.

#### Литература

1. Аринбасарова А.Ю., Бiryukova Е.Н., Меденцев А.Г. Антистрессовые системы у дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 122-131.
2. Jones B., de Ronde C.E.J. and Renaut R.W. Mineralized microbes from giggenbach submarine volcano // J. Geophys. Res. 2008. V. 113. doi:10.1029/2007JB005482.
3. Otzen D. The role of proteins in biosilicification. Scientifica (Cairo). 2012: 867562. doi:10.6064/2012/867562.
4. Coskun D., Britto D.T., Huynh W.Q., Kronzucker H.J. The role of silicon in higher plants under salinity and drought stress // Front Plant Sci. 2016.V. 18 № 7. P. 1072.
5. Darvishi Harzevili F, 2014. Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica*, *SpringerBriefs in Microbiology*. Springer International Publishing, Cham.
6. Arinbasarova A., Machulin A., Biryukova E., Sorokin V., Medentsev A. and Suzina N. Structural changes in the cell envelope of *Yarrowia lipolytica* yeast under stress conditions // The Canadian Journal of Microbiology. 2018. doi: 10.1139/cjm-2018-0034.

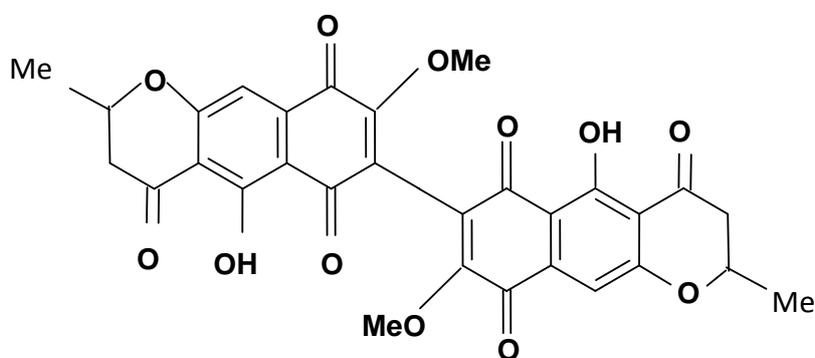
## Механизм токсического действия аурофузарина – димерного нафтохинона гриба *Fusarium decemcellulare*

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
aarin@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_67-69

Взаимодействие видов определяется большим набором факторов, среди которых особое место занимает биосинтез биологически активных вторичных метаболитов, в том числе нафтохинонов.

Нафтохиноновые метаболиты грибов представляют огромный интерес, поскольку проявляют широкий спектр биологического действия – антибиотическое, цитотоксическое и др. [1]. Некоторые нафтохиноны вызывают неблагоприятные токсические эффекты у людей и животных и классифицируются как микотоксины [2].



Ауруфузарин - классический пример микотоксинов, синтезируемый различными видами *Fusarium*. Токсин находят в продуктах питания и кормах из разных климатических регионов мира, включая Азию, Африку и Европу [1, 2].

Ранее нами из культуральной жидкости гриба *Fusarium decemcellulare* ВКМ F- 1179 был выделен внутриклеточный желтый пигмент, идентифицированный как димерный нафтохинон ауруфузарин [3].

Показано также, что ауруфузарин проявляет антимикробную активность - подавляет рост бактерий родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, а также грибов *Yarrowia*, *Torulopsis* и *Penicillium* [3].

В настоящей работе показано влияние ауруфузарина на дыхательную активность дрожжей и бактерий, а также генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках.

Ауруфузарин в концентрациях 1-5 мкМ подавлял перенос электронов по дыхательной цепи при окислении митохондриями различных субстратов: сукцината,  $\alpha$ -глицерофосфата, (пирувата + малата) или НАДН (Рис. 1). При этом отмечалось падение трансмембранного потенциала.

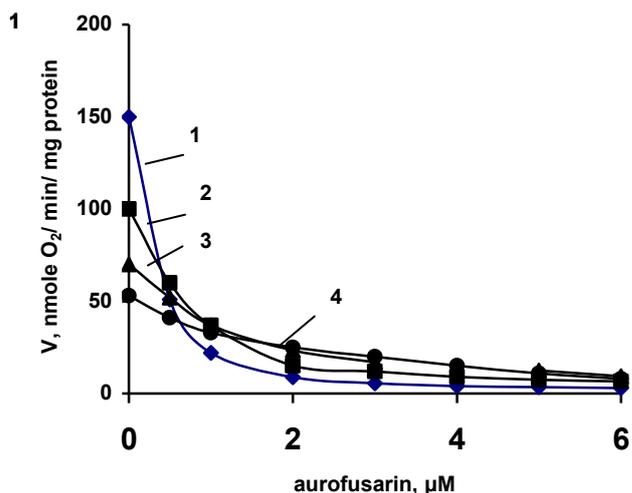


Рис. 1. Влияние ауруфузарина на потребление кислорода митохондриями дрожжей (0,9 мг белка/мл) в присутствии различных субстратов.

1. НАДН (1 мМ),
2.  $\alpha$ -глицерофосфат (10 мМ),
3. пируват (5 мМ) + малат (5 мМ),
4. сукцинат (10 мМ).

Потребление кислорода измеряли с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода Кларка при температуре 22 °С.

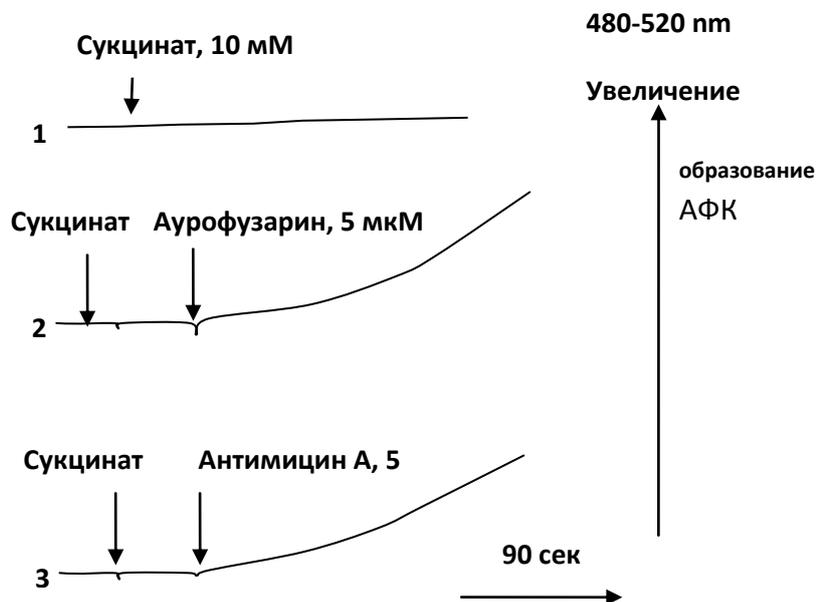


Рис. 2. Влияние ауруфузарина и антимицина А на образование АФК в митохондриях дрожжей. Митохондрии – Мх (0,8 мг белка/мл), сукцинат (10 мМ).

Образование АФК оценивали по люминесценции красителя дигидро-2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата при 480-520 нм.

Показано также, что в присутствии ауруфузарина наблюдалось внутриклеточное образование АФК, на что указывает заметный рост флуоресценции (рис. 2).

Аналогичные эффекты отмечались также в присутствии антимицина А, классического ингибитора дыхательной активности.

Нарушение энергетического статуса и увеличение внутриклеточного содержания АФК в присутствии нафтохинона было обнаружено также у бактерий: *Pseudomonas putida* ВКМ В-1301, *P. aerofaciens* ВКМ В-901, *Arthrobacter globiformis* ВКМ В-658.

Таким образом, ауофузарин ингибирует дыхательную цепь дрожжей и бактерий, что приводит к полной деэнергизации клетки. Кроме того, ауофузарин провоцирует внутриклеточное образование АФК, что создает условия эндогенного окислительного стресса.

Вероятно, указанные эффекты и антимиохондриальная активность лежат в основе токсического действия ауофузарина. Можно полагать, что биосинтез вторичного метаболита ауофузарина является одной из стратегий адаптации гриба-продуцента к окружающей среде, позволяющей ему успешно конкурировать с другими микроорганизмами.

### Литература

1. K. Jarolima, K. Woltersa. The secondary Fusarium metabolite aurofusarin induces oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human colon cell // Toxicology Letters. 2018. 284 P. 170–183
2. L. Matumba, Sulyok, M., Krska, R., Fungal metabolites diversity in maize and associated human dietary exposures relate to micro-climatic patterns in Malawi // World Mycotoxin J. 2015. 8, 269–282.
3. Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г. Ауофузарин – внутриклеточный димерный нафтохинон гриба *Fusarium decemcellulare* //V Пущинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов". 3-7 декабря 2018. Пущино. С. 54-55. ISBN 978-5-9909335-6-9.

## Гетерологичная экспрессия тетрагемового цитохрома с анаэробной бактерии *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Архинова О. В., Захарова М. В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино;  
aroksan@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_69-71

Периплазматическая метакрилатредуктазная активность была обнаружена у трёх анаэробных грамотрицательных бактерий *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 (класс *Deltaproteobacteria*) и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809 (класс *Deferribacteres*) [1,2]. Метакрилатная редокс система *G. sulfurreducens* AM-1 является терминальным звеном в процессе метакрилатного дыхания. Она состоит из флавиносодержащей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и четырёхгемового цитохрома с Mcc (30 кДа) [1]. Гены *mrd* и *mcc*, кодирующие гомологичные хромопротеиды метакрилатных редокс систем *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*, организованы в один оперон в геномах этих анаэробов [3]. Для последующих биохимических исследований уникальной метакрилатной редокс системы гены *mrd* и *mcc* *G. sulfurreducens* были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* [4]. Однако уровень экспрессии растворимого Mcc оказался низким. Гетерологичная экспрессия периплазматических цитохромов с анаэробных бактерий, даже

не мультигемовых, а содержащих 1-2 гема, – задача нетривиальная. Незрелый белок этих цитохромов синтезируется с сигнальной последовательностью типа Sec, которая отщепляется при переносе белка через мембрану в периплазму [5,6]. Окончательное созревание цитохромов *c* осуществляется в периплазме после ковалентного связывания с белком гемов *c* [5,7]. Случаи успешной продукции растворимых мультигемовых цитохромов *c* анаэробов в настоящее время единичны [8,9].

Целью работы был поиск приемлемого способа гетерологичной экспрессии Msc *G. sulfurreducens*. Для достижения поставленной цели мы проверили разные факторы, которые могут способствовать правильному биогенезу анаэробных цитохромов *c* в процессе гетерологичной экспрессии, т.е. образованию в результате растворимого периплазматического цитохрома *c*.

Были опробованы 2 типа отщепляемых сигнальных последовательностей, способствующих преодолению плазматической мембраны. Сначала клонировали полный ген *mss*, включая лидерную последовательность типа Sec длиной 23 аминокислоты, в плазмиду pQE30 под промотором бактериофага T5. Однако, экспрессия рекомбинантного Msc в клетках *E. coli* M15[pREP4] привела к локализации этого белка в телах включения. Этот факт послужил основанием для замены природной последовательности Sec на лидерную *relB*. Кодированный фрагмент гена *mss* после слияния с отщепляемым пептидом *relB* был клонирован в плазмиду pET22 и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21(DE3). Результатом оказалась продукция Msc в телах включения.

Была выполнена смена экспрессионного штамма для продукции целевого белка [8]. Для проверки этой гипотезы и сравнения с вариантами экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) мы использовали экспрессионный штамм *E. coli* C41(DE3). Небольшое количество рекомбинантного Msc обнаружили в растворимой фракции клеток C41(DE3).

Для корректного биогенеза периплазматических цитохромов *c* была осуществлена коэкспрессия со вспомогательной плазмидой pEC86, содержащей кластер генов *csm* *E. coli* [8-14], в клетках *E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3). Применение pEC86 увеличило количество целевого белка, хоть он присутствовал в основном в телах включения.

Для повышения выхода растворимого белка была снижена концентрация индуктора IPTG (200 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ) [8,9,11], однако существенного влияния на экспрессию количества IPTG не было обнаружено. Понижение температуры индукции с 25°C до 15°C привело к существенному уменьшению уровня продукции целевого белка.

Для улучшения растворимости целевого белка были использованы соли и/или детергенты [9]: неионные детергенты (додецилмальтозид, или Твин 20, или Тритон X-100 в концентрации 2%), NaCl (1M), а также сочетания указанных детергентов и NaCl. Инкубация клеток в буфере, содержащем NaCl, не приводила к повышению растворимости рекомбинантного Msc, в отличие от ранее описанных экспериментов [9]. Однако, обработка клеток буфером с додецилмальтозидом приводила к повышению уровня растворимости рекомбинантного Msc более, чем в 2 раза.

Таким образом, в настоящее время мы располагаем рядом приемлемых условий для экспрессии анаэробного рекомбинантного тетрагемового цитохрома *c* Msc в клетках *E. coli* и способом повышения его растворимости. Данные по гетерологичной экспрессии гена цитохрома *c* Msc *G. sulfurreducens* в клетках *E. coli* внесут вклад в исследование мультигемовых цитохромов *c* анаэробов, а также в разработку новых подходов к генно-инженерным работам с ними.

## Литература

1. Mikoulinskaia (Arkhipova) et al. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.
2. Архипова и др. Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 144–153.

3. Arkhipova et al. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
4. Захарова и др. IV Пушинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов". 4-8 декабря 2017. Пушино. С. 54-56.
5. Thöny-Meyer et al. Molecular Microbiology. 1994. 12: 1–9.
6. Bagos et al. Bioinformatics. 2010. 26: 2811–2817.
7. Li et al. BMC Structural Biology. 2011. 11
8. Londer et al. Protein Expression and Purification. 2005. 39. 254–260.
9. Londer et al. Protein Expression and Purification. 2006. 47: 241–248.
10. Arslan et al. Biochem Biophys Res Commun. 1998. 251(3): 744-747.
11. Londer et al. Biochim Biophys Acta. 2002. 1554: 202-211.
12. Heitmann D. and Einsle O. Biochemistry. 2005. 44: 12411 -12419.
13. Pokkuluri et al. Biochimica et Biophysica Acta. 2010. 1797: 222–232.
14. Dantas et al. FEBS Letters. 2013. 587: 2662–2668.

## **Биологические особенности эпизоотически актуального для Российской Федерации вируса геморрагической болезни кроликов**

*Балашова Е.А., Сливко И.А., Живодеров С.П., Луницин А.В.*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»  
Владимирская область, п. Вольгинский; info@ficvim.ru

В октябре 2018 г. в ФГБНУ ФИЦВиМ поступил патологический материал от павших кроликов из животноводческого хозяйства Тверской области. Из печени кролика был выделен изолят вируса геморрагической болезни кроликов, который идентифицировали с использованием реакции гемагглютинации. Электронной микроскопией установили наличие вирионов рода *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*. Типовую принадлежность вируса определяли методом секвенирования гена VP60. Исследования образца суспензии печени в специфической ОТ-ПЦР в режиме реального времени показали наличие генома вируса ВГБК-2 (подтверждена высокая гомология выделенного вируса с циркулирующим в западной Европе). Изоляту присвоили наименование «RHDV2-RUS69/2018».

Целью дальнейших исследований был анализ инкубационного периода при экспериментальном заражении, длительности болезни, летальности, выраженности клинических признаков и посмертных изменений, чувствительность к вирусу геморрагической болезни кроликов разной возрастной категории, определения инфекционной активности.

В работе использовали кроликов породы Шиншилла массой тела более 2,5 кг и крольчат 2-3-недельного возраста, выращенных в Отделе подготовки подопытных животных ФГБНУ ФИЦВиМ. Содержали животных в изолированном боксе.

Для определения инфекционной активности (множественности) изолята вируса использовали исходную 10 %-ную суспензию печени, из которой готовили десятикратные разведения от  $10^1$  до  $10^7$ . Титр вируса вычисляли по упрощенной схеме Рида и Менча и выражали в Ig ( $LD_{50}/cm^3$ ).

Животным вирусосодержащий материал вводили внутримышечно по 1 см<sup>3</sup>, ведя за ними ежедневное наблюдение каждые 3-4 часа. На одно разведение использовали по 4 кролика весом более 2,5 кг и по 4 крольчонка 3-4 недельного возраста.

Гибель взрослых кроликов и крольчат наблюдали со вторых суток после заражения. Животные до гибели были внешне здоровы, за 1-2 часа до гибели у них появлялось угнетенное состояние, отсутствие аппетита, небольшие истечения из носа и рта. Смерть

наступала молниеносно: животные падали на бок слегка выгибая спину, совершали несколько судорожных движений и погибали. В опыте пали все животные в течение пяти суток. Инфекционная активность изолята «RHDV2-RUS69/2018» составила 6,5 lg ЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

У павших животных отмечали изменения в органах: отек и кровоизлияния в легких, увеличение и дряблость печени, увеличение почек и селезенки.

На основании данных, представленных в тезисе, изолят «RHDV2-RUS69/2018» вируса геморрагической болезни кроликов является высоко вирулентным и подтверждает патогенность данного вируса, вызвавшего вспышку в октябре 2018 г. в хозяйстве Тверской области.

В Российской Федерации идентифицирован новый тип вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК) второго типа, который характеризуется высокой летальностью (90-100 %) для домашних кроликов, в том числе привитых против ВГБК первого типа. ФГБНУ ФИЦВиМ закончил клинические испытания вакцины против ВГБК, которая содержит антигены первого и второго типов ВГБК. Требуется обязательная вакцинопрофилактика здорового поголовья кроликов в комплексе противоэпизоотических мер, направленных на борьбу с вирусной геморрагической болезни кроликов.

## **О проблеме инвариантности межгеномной дистанции у прокариот**

*<sup>1</sup>Василенко О.В., <sup>2</sup>Георгиева З.Д.*

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ВКМ

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Кубанский Государственный университет, биологический факультет;  
ovvasilenko@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_72-75

Рассмотрена проблема устойчивости значений относительной межгеномной дистанции (ОМД) при изменении качества геномной сборки, или, иначе говоря, - зависимость относительной межгеномной дистанции, вычисленной через среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) от значения среднего покрытия геномной сборки и общепринятых критериев качества сборки. Соотношение между ними простое: ОМД = 100% - ANI.

С развитием геномики роль так называемых геномных индексов - особых показателей, вычисляемых непосредственно из последовательности нуклеотидов генома, - возрастает. Они стали главнейшим критерием в определении принадлежности штамма к одному из известных или к новому виду (1). Среди них ANI (ОМД) выделяется тем, что имеет объективный и интуитивно понятный общий алгоритм вычисления, высокую точность вычисления и вполне определенный фундаментальный (эволюционный) смысл. Несколько способов вычисления ANI соответствуют нескольким разновидностям ANI. Пригодны для практического применения три из них (ANIb, orthoANI и FastANI), которые при соблюдении определенных условий дают почти идентичные результаты (1-5). Особое значение приобрел ANI после того, как было показано, что секвенирование геномов решает те проблемы в идентификации клинических образцов бактерий, которые не решает масспектрометрический подход (MALDI-TOFF) (6). Важность проблемы, эффективность подхода, вектор научно-технического прогресса вкупе с авторитетом и энергией авторов данной инициативы не оставляют сомнений в скором утверждении этого подхода в качестве клинического стандарта в дополнении к фундаментальному таксономическому. Тем более удивляет то обстоятельство, что до настоящего момента не изучен вопрос о том, как зависит ОМД от качества сборки. Есть общие слова о пригодности даже

неполных драфт-геномов для вычисления ANI, но нет других, кроме эстетических, критериев пригодности геномной сборки для видовой идентификации штаммов. И если отвергнутый журналом геном по таким основаниям, как "слишком большое количество контигов" - это неприятность, которую можно пережить, то несвоевременное принятие клинически важного решения по аналогичному поводу - это то, что может иметь, без преувеличения, тяжкие последствия.

Наиболее существенная причина, по которой бывает невозможно собрать геном нужного качества, - это недостаток подходящих первичных ридов. Их дополнительная наработка - это новый дорогостоящий запуск секвенатора, который надо не только оплатить, но и собрать нужный объем библиотек, а затем просто провести сам запуск. Всегда ли это необходимо и оправдано? Это очень важный вопрос, и он до настоящего времени был без ответа. Мы поставили задачу ответить на него моделированием ситуаций с различным качеством сборок, которое является следствием изменяющегося покрытия. Для этого мы выбрали пять различных сборок бактерий хорошего и удовлетворительного качества, для которых были нам также доступны и первичные риды в формате fastq. Список геномов и коды доступа приведены в Таблице 1. Мы отбирали псевдослучайным образом только часть ридов так, что прогнозируемое покрытие составляло меньшую величину, чем исходная "образцовая" сборка, собирали риды при помощи программы SPAdes 3.13.1 (7), получая несколько - до десяти - сборок, отличающихся покрытием и зависящим от него качеством. Сборки сравнивали между собой и исходной, взятой в качестве "референса", при помощи программы QUAST 5.0.2 (8). Настройки программы были таковы, что она выдавала ряд параметров сборки не только формально-статистического описательного типа (N50, число контигов/скаффолдов и т.п.), но и из области функциональной геномики.

Табл. 1. Список геномных сборок, использованных в работе

Код доступа	Видовое название	Штамм	Платформы	Покрытие
MASI00000000.1	<i>Methylobacteria halotolerans</i>	VKM B-2706 <sup>T</sup> (C2 <sup>T</sup> )	IonTorrent	115
MCRI00000000.1	<i>Methylobacteria muralis</i>	VKM B-3046 <sup>T</sup> (Bur 1 <sup>T</sup> )	IonTorrent	75
MUKN01000000	<i>Rathayibacter</i> sp.	VKM Ac-2630	IonTorrent	34
FXBM00000000.1	<i>Rathayibacter oskolensis</i>	VKM Ac-2121 <sup>T</sup>	Illumina IonTorrent	222
NZ_FXAY00000000.1	<i>Agreia pratensis</i>	VKM Ac-2510	Illumina	214

Межгеномную дистанцию между сборками и внешним, но филогенетически близким геномом вычисляли при помощи программы orthoANI (4). В программу Microsoft Excel загружали данные QUAST, orthoANI и заданные величины покрытия. Строили графики зависимостей от величины покрытия таких эмпирических функций, как ОМД, а также вычисленных в QUAST показателей качества сборки (число контигов с длиной больше нуля (# contigs ( $\geq 0$  bp)); общая длина контигов (Total length ( $\geq 0$  bp)); наибольший контиг (Largest contig); длина медианного контига/скаффолда (N50); число неопределенностей на 100 килобаз (# N's per 100 kbp); доля полных обязательных ортологичных генов в сборке (Complete BUSCO (%)); и, соответственно, неполных генов (Partial BUSCO (%)), а также GC-состав (GC (%)). Для того, чтобы все функции можно было отразить на одном графике, их значения нормировали по максимальному из их выборки, которое принимали за 100%, конечно, если значения функций не были выражены в процентах в пределах 0-100% по умолчанию.

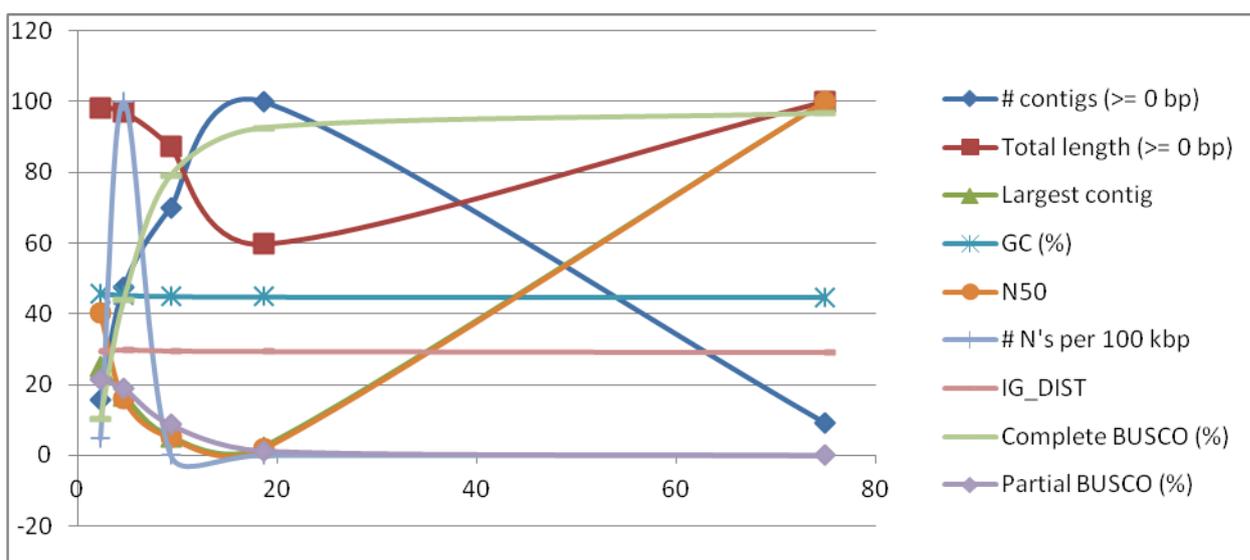


Рис. 1. График зависимостей от глубины секвенирования (покрытия, ось абсцисс) показателей качества сборок и других параметров (объяснения в тексте выше). Ось ординат - все значения функций в процентах. Объект: сборки *Methylophaga murali*.

Типичный результат показан на Рис. 1. Отчетливо видно, что ОМД не зависит ни от одного из показателей качества сборки и ни с одним из них не коррелирует, не зависит и от величины покрытия. Точно так же ведет себя GC-состав, который, очевидно, является коровой характеристикой генома и стабилен по закону больших чисел, если в сборке есть достаточное количество "букв". Аналогия с ОМД не случайная, но для описания данного явления не существует общепризнанных терминов. Образно говоря, коровое свойство генома - это его собственные характеристические координаты в пространстве эволюционных путей. Поэтому как только появляется модель генома (сборка), у него появляются определенные характеристические расстояния до соседних геномов как следствие фиксированности координат. Действует закон "все или ничего": есть геном или сборка - есть координаты и расстояния, нет сборки (генома) - нет координат.

Вывод. ОМД и ANI являются наиболее нетребовательными к качеству сборки параметрами, производными из генома. В области малых покрытий, много меньших, чем десять, погрешность определения межгеномной дистанции до внешнего штамма не превышает обычно 1%, в то время как внутривидовая изменчивость межгеномной дистанции может быть до 5%. Нет необходимости чрезмерно пренебрегать качеством

секвенирования, если геномные сборки будут использованы только для систематики или типирования штаммов в прикладных целях (в медицине), но так же и нет необходимости уклоняться от принятия таксономических или, тем более, диагностических решений на том основании, что сборка выглядит неэстетично, - для этого не найдено ни оснований ни оправданий.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01347.*

#### Литература

1. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal D, da Costa M, Rooney A, Yi H, Xu X, De Meyer S, Trujillo M. 02/01/2018. Int J Syst Evol Microbiol 68(1):461-466 doi:10.1099/ijsem.0.002516.
2. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc. Natl Acad. Sci. 2009;106:19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
3. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. PeerJ Prepr. 2016;4:e1900v1.
4. Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016;66:1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.
5. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun. 2018;9(1):5114. Published 2018 Nov 30. doi:10.1038/s41467-018-07641-9.
6. Ha SM, Kim CK, Roh J, Byun JH, Yang SJ, Choi SB, Chun J, Yong D. Application of the Whole Genome-Based Bacterial Identification System, TrueBac ID, Using Clinical Isolates That Were Not Identified With Three Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. Ann Lab Med. 2019 Nov;39(6):530-536. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.6.530>.
7. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics, 2013, 29 (8), 1072-1075.
8. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V., Nikolenko S., Pham S., Prjibelski A., Pyshkin A., Sirotkin A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology, 2012.

### **Определение оптимальных условий совместной экспрессии белков семейства «EF-руки» с N-концевыми ацетилтрансферазами *E.coli***

*Вологжанникова А. А., Соколов А. С., Пермякова М. Е., Лаптева Ю. С.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН;  
[yulia.s.lapteva@gmail.com](mailto:yulia.s.lapteva@gmail.com), DOI: 10.18334/ibpm2019\_75-76

Большинство белков эукариот подвергается N-концевому ацетилированию, что может существенным образом изменять их структурные и функциональные свойства [1]. Нами было установлено влияние N-концевой ацетильной группы на структурные и функциональные свойства некоторых белков семейства «EF-руки» [2-3]. Белки S100 и парвальбумины - это небольшие кальцийсвязывающие белки позвоночных, выполняющие в организме поддержание гомеостаза кальция в клетке, регуляцию ее роста и дифференцировки. Отдельные белки семейства S100 ассоциированы с заболеваниями

человека и служат маркерами таких патологических состояний как рак и нейродегенеративные заболевания. Рекомбинантные белки эукариот, нарабатываемые в бактериях, часто не подвергаются N-концевому ацетилированию. В этой связи актуальна разработка метода *in vivo* N<sup>α</sup>-ацетилирования (N<sup>α</sup>-АЦ) рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии.

Для N<sup>α</sup>-АЦ целевых белков в условиях *in vivo* гены ряда парвальбуминов и белков S100 были клонированы в плазмидный вектор pET-Duet в паре с геном одной из трех АТ *E.coli*. Вектор pET-Duet содержит в своем составе два гибридных промотора T7/lac и сконструирован таким образом, что позволяет проводить наработку в клетках одновременно двух белков. Мы проводили ко-экспрессию в штамме BL21(DE3) *E. coli*. Нами было исследовано влияние на уровень экспрессии целевых белков таких параметров как, состав питательной среды, температура и метод индукции.

Нами показано, что уровень наработки целевых и степень их N<sup>α</sup>-АЦ зависит от условий культивирования. Так, нами установлено, что при совместной экспрессии в сконструированной нами системе предпочтительно нарабатывается АТ. Уровень целевого белка часто ниже, но в ряде случаев сопоставим с уровнем АТ. При ко-экспрессии на «богатой» среде (2xYT), по сравнению с «бедной» (M9), не изменяется уровень АТ, но увеличивается уровень наработки целевого белка. Запуск синтеза генов методом автоиндукции, по сравнению с ИПТГ, позволяет увеличить наработку целевого белка в паре с АТ RimJ, для которой показан токсический эффект для клеток при суперэкспрессии.

После совместной экспрессии целевые белки (ПА и белки S100) были выделены и очищены с использованием специфических для каждого белка ряда хроматографий. Уровень N<sup>α</sup>-АЦ определяли при помощи масс-спектрометрии. Нами показано, что АТ *E. coli* в условиях *in vivo* проявляют специфическую ферментативную активность по отношению к белкам семейства «ЕF-руки». Уровень N<sup>α</sup>-АЦ белков зависит от условий культивирования клеток, он повышается при понижении скорости роста культуры и, в ряде случаев, достигает 50%. Таким образом, нами показано возможность применения бактериальных АТ для N<sup>α</sup>-АЦ рекомбинантных белков эукариот в условиях *in vivo*.

*Данное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00701.*

#### Литература

1. Drazic, A., et al. The world of protein acetylation // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. – V. 1864: P 1372-1401.
2. Vologzhannikova, A.A., et al. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin β-1 from coho salmon // *Cell Calcium.* - 2017. – V. 67. - P 53-64.
3. Permyakov, S.E., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin // *Cell Calcium.* - 2012. – V. 52 (5). – P 366-76.

# Изучение ростовых характеристик штаммов рода *Delftia*, содержащих последовательность гена салицилат 5-гидроксилазы и нафталин-1,2-диоксигеназы

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН);  
sazonova\_oi@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_77-79

В работе исследовали три штамма рода *Delftia* (ULwDis2, ULwDis3, ULwNAN1), способных к катаболизму полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Данные бактериальные штаммы были изолированы методом накопительных культур из проб морской воды Финского залива Балтийского моря, отобранных в летний период у порта Усть-Луга [1]. Два штамма – ULwDis2 и ULwDis3 – были выделены на дизельном топливе в качестве единственного источника углерода и энергии, штамм ULwNAN1 – на нафталине. Данные штаммы способны к росту на средах с нефтью, дизельным топливом, фенантроном, и нафталином. Нафталин, являясь двухкольцевым углеводородом, представляет собой самое простое соединение среди ПАУ. Биохимические пути и генетические системы катаболизма нафталина наиболее изучены у бактерий рода *Pseudomonas* и родственных им бактериям. Известно, что нафталин через серию реакций окисляется до салицилата, последний может утилизироваться двумя способами: трансформацией в катехол с помощью салицилат гидроксилазы, либо, посредством салицилат 5-гидроксилазы, в гентизат. В исследуемых штаммах *Delftia* spp. методом ПЦР с последующим секвенированием полученных ампликонов было показано наличие последовательностей генов, характерных для оперонов деградации нафталина через салицилат и гентизат (*nag*-оперонов) [1]. У деструкторов, относящимся к  $\beta$ -протеобактериям, распространены катаболические опероны, контролируемые альтернативный путь деградации нафталина через гентизат, тем не менее для штаммов *Delftia* spp. наличие *nag*-генов показано нами впервые. Для изучения функциональности выявленных генов мы изучали физиологические свойства этих штаммов, а именно их ростовые характеристики на минеральных средах (Эванса [2] и Канада [3]) с одним из следующих субстратов: 1) нафталин; 2) салицилат натрия; 3) сукцинат натрия.

Несмотря на то, что во всех трех штаммах *Delftia* spp. присутствует ген, кодирующий салицилат 5-гидроксилазу, роста на минеральной среде с салицилатом натрия в качестве единственного источника углерода и энергии не наблюдалось.

Для эффективной деградации трудно разлагаемых полициклических углеводородов (нафталина) необходимо подобрать оптимальные условия для роста бактериальной культуры. Одним из важных условий является подбор минимальной среды для наращивания биомассы бактериальных штаммов в целях их дальнейшего использования в биоремедиации загрязнённых сайтов. В качестве критериев оптимальности сред использовали значения следующих параметров:

- 1) удельная скорость роста
- 2) максимальная оптическая плотность
- 3) длительность лаг-фазы

Чем выше удельная скорость роста, максимальная оптическая плотность и меньше длительность лаг-фазы, тем более оптимальной считается среда для роста микроорганизмов.

Как видно из таблицы 1, удельные скорости роста на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии у штаммов *Delftia* sp.ULwDis2 и ULwDis3 на минимальной среде Канада выше на 35%, чем на среде Эванса, а у штамма *Delftia* sp. ULwNAN1 остаётся на том же уровне. Максимальная оптическая плотность также на среде

Канеда выше на 15% (как минимум), чем на среде Эванса. Длительность лаг-фазы у всех исследуемых штаммов меньше на среде Канеда. Анализ всех этих данных говорит о том, что минимальная среда Канеда более оптимальная для наработки биомассы исследуемых штаммов, чем наиболее часто используемая в нашей лабораторной практике минимальная среда Эванса. Наиболее очевидным фактом является различие исследуемых сред по количеству источника азота - в среде Канеда азота в 6 раз больше, чем в среде Эванса. Этим можно объяснить более оптимальные условия для роста штаммов именно в среде Канеда.

Табл. 1. Анализ роста культур *Delftia* spp. на различных минимальных средах

Параметры	Среда	<i>Delftia</i> sp. ULwDis2	<i>Delftia</i> sp. ULwDis3	<i>Delftia</i> sp. ULwNAH1
Удельная скорость роста	Среда Эванса (Нафталин)	0.13	0.12	0.16
	Среда Канеда (Нафталин)	0.2	0.2	0.16
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	0.45	0.48	0.57
Максимальная оптическая плотность	Среда Эванса (Нафталин)	1.78	2.0	2.0
	Среда Канеда (Нафталин)	2.36	2.35	2.39
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	1.74	1.77	1.72
Длительность лаг-фазы	Среда Эванса (Нафталин)	13 часов	14 часов	16 часов
	Среда Канеда (Нафталин)	11 часов	12 часов	12 часов
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	6 часов	6 часов	7 часов

Для сравнения полученных результатов в дальнейшем исследовании в качестве единственного источника углерода был использован более легкодоступный субстрат, такой как сукцинат (табл. 1). Как видно из таблицы, удельная скорость роста на сукцинате на оптимальной минимальной среде выше более, чем в два раза по сравнению с ростом на нафталине. Также меньше в два раза длительность лаг-фазы. Но для достижения такого выхода биомассы, как на среде с нафталином, необходимо увеличить концентрацию сукцината до 30 мМ. Также было показано, что максимальная оптическая плотность на среде Эванса с 10 мМ сукцината на 30% меньше, чем на минимальной среде Канеда в тех же условиях (данные не приводятся).

Таким образом, изучение ростовых характеристик исследуемых штаммов *Delftia* spp. указывает на то, что для наращивания биомассы штаммов в целях их дальнейшего

использования в биоремедиации загрязнённых сайтов наиболее оптимальной является среда Канеды.

#### Литература

1. Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний периоды // Микробиология, 2018. Т.87. №2. С. 204-214.
2. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms: II. Construction of a chemostat // Methods Microbiol. 1970. V. 2. P. 277–327.
3. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Bykova T.V., Trotsenko Yu.A. *Methylophila musalis* sp. nov., a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1847–1852.

### **Разработка подхода к исследованию свойств каспазы-3 методом детекции флуоресценции одиночных молекул**

<sup>1</sup>Грановский И.Э., <sup>1</sup>Холод Н.С., <sup>1</sup>Шляпников М.Г., <sup>2</sup>Соловьев И.Д., <sup>2</sup>Гавшина А.В.,  
<sup>2</sup>Савицкий А.П.

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; lci857@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_79-80

Ферменты являются ключевыми элементами метаболизма. Они катализируют множество разнообразных химических реакций, протекающих в организме в процессе его жизнедеятельности. Катализ химической реакции - это динамический процесс, включающий в себя стадии связывания субстрата, собственно катализа и высвобождения продуктов реакции. Развитие технологий флуоресцентной микроскопии сделало возможным проводить исследования единичных молекул фермента, т.е. фактически наблюдать за катализом в режиме реального времени в миллисекундном или секундном временном диапазоне. Это позволяет определять константы скоростей прямой и обратной реакций без применения технологий быстрого смешивания, что открывает новые возможности в изучении механизмов катализа и регуляции активности ферментов. Одна из технологий анализа одиночных молекул - TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) позволяет возбуждать флуоресценцию в тонком приповерхностном слое и наблюдать лишь иммобилизованные флуоресцирующие ферментативные комплексы. Альтернативно, может быть использован конфокальный режим измерения флуоресценции с фокусировкой на поверхности в точке иммобилизации фермента.

Данная работа направлена на адаптацию метода анализа флуоресценции одиночных молекул для исследования энзиматических свойств и регуляции активности каспазы-3 - одного из ключевых факторов апоптоза. Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, выполняет множество важных функций в многоклеточном организме, включая поддержание гомеостаза и морфогенез, а также элиминацию зараженных клеток при вирусной инфекции. Каспаза-3 синтезируется в виде неактивного пропрекурсора, который существует в форме гомодимера. Она является одной из трех эффекторных каспаз, активация которых переводит апоптотическую гибель клетки в необратимую стадию. Как

следствие, процессы активации и активность каспазы-3 находятся под строгим контролем клетки. Некоторые сложные вирусы, например, такие как вирус африканской чумы свиней, также кодируют белки, регулирующие активность каспазы-3 для подавления клеточного противовирусного ответа. Исследования энзиматических свойств и механизмов регуляции активности каспазы-3 помимо фундаментального, имеют также прикладное значение с точки зрения разработки новых подходов к противовирусной устойчивости животных.

Для исследования ферментативных свойств каспазы-3 методом детекции флуоресценции одиночных молекул, мы разработали систему получения прокаспазы-3 в гетеродимерной форме: одна ее субъединица слита на С-конце с биотинилирующимся пептидом Avi-tag, тогда как С-конец другой субъединицы помечен молекулой eGFP, а также содержит кальмодулинсвязывающий пептид. ОРС химерных субъединиц прокаспазы-3, а также ген *birA* биотин-лигазы - для более эффективного биотинилирования Avi-tag *in vivo* - были совместно экспрессированы в клетках *E. coli*. Очистку химерной каспазы-3 из клеток проводили с использованием хроматографии на носителях с иммобилизованным кальмодулином и стрептавидином.

Для проведения измерений на микроскопе были предложены две схемы проточной системы непрерывной подачи растворов в область наблюдения. В первом случае изготавливалась основа из полиметилметакрилата с отверстиями для капилляров. Далее крепился слой из двусторонней клейкой ленты, в которой с помощью лазерной резки были выполнены протоки между отверстиями в основе. Последним слоем выступает покровное стекло, которое является подложкой для иммобилизации. Во втором случае использовали основу из полидиметилсилоксана, которая была получена заливкой в форму с нанесенными на стекло протоками. Такая основа имеет хорошую адгезию к покровному стеклу, раствор к протокам поступает через металлические капилляры из шприцевых игл диаметром 0,6 мм.

Для иммобилизации каспазы-3 использовали систему «стрептавидин – биотин». Первым слоем наносили смесь БСА с биотинилированным БСА, а затем последовательно стрептавидин и иммобилизуемый фермент. После каждой стадии вели промывку и контроль чистоты наносимого препарата на наличие флуоресцирующих примесей. Для получения флуоресцирующих пятен отдельных молекул подбиралась степень разрежения биотинилированных центров на подложке путем варьирования соотношения БСА/БСА-биотин. Принцип регистрации констант взаимодействий основывается на анализе статистики времен (“on” и “off” времен) пребывания лиганда в области иммобилизованного фермента. В качестве субстрата выбран рекомбинантный FRET-субстрат, гидролизующий каспазой-3 – TagRFP-23-KFP.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-08010.*

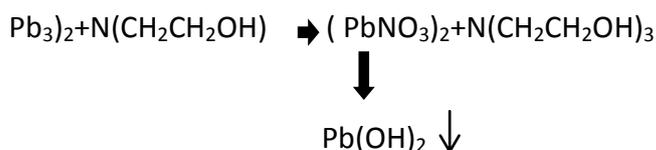
## **Метод электронно-микроскопического выявления гидролаз на дрожжевых экзоцеллюлярных компонентах**

***Дмитриев В. В., Звонарев А. Н., Русакова Т. Г.***

ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;  
dmitriev@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_80-82

Целью данной работы является подбор наиболее эффективного метода электронно-микроскопического выявления гидролаз на дрожжевых экзоцеллюлярных компонентах — структурах, наименее изученных в функциональном отношении.

В настоящее время основным подходом для обнаружения липаз и некоторых других гидролаз в электронной микроскопии является принцип Гомори, основанный на связывании продукта реакции с ионами солей свинца, в котором в качестве субстратов используются твины [1]. Однако использование твинов, являющихся поверхностно-активными веществами, для выявления ферментов на экзоцеллюлярных компонентах дрожжей связано с большими трудностями, так как это приводит к солюбилизации и удалению белков и продуктов реакции в процессе цитохимического исследования (рис 2А). Оказалось, что всеми необходимыми свойствами субстрата электронно-цитохимического выявления гидролаз типа липазы обладает кремнийорганическое соединение 1-хлорметилсилатран (ХМС). Было выяснено, что триэтаноламин (ТЭА), являющийся продуктом ферментативной реакции гидролиза ХМС, связывается с ионами нитрата свинца  $Pb(NO_3)_2$ , образуя нерастворимый в воде комплекс. В то же время показано, что ХМС в реакцию с  $Pb(NO_3)_2$  не вступает.



Спектрофотометрически прослежено, что первоначально происходит образование комплекса ТЭА с нитратом свинца (максимум поглощения при 263 нм) (рис. 1), образующийся при этом комплекс неустойчив и распадается с образованием гидроокиси свинца, которая выпадает в электронно-плотный осадок, нерастворимый в воде и какодилатном буфере.

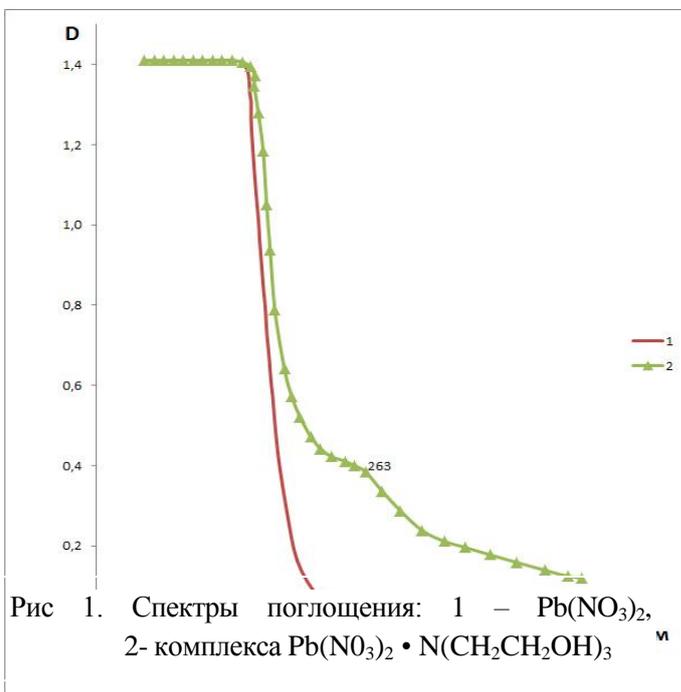


Рис 1. Спектры поглощения: 1 –  $Pb(NO_3)_2$ , 2- комплекса  $Pb(NO_3)_2 \cdot N(CH_2CH_2OH)_3$  nm

Спектры  $Pb(NO_3)_2$  триэтанолamina (ТЭА) и продуктов их взаимодействия были получены на спектрофотометрах «Specord UV» (УФ-область) и «Specord IR» (ИК-область) фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Строение нерастворимого продукта было доказано данными элементного анализа, проведенного на атомно-абсорбционном спектрометре ААС-1 (Германия) на свинец. Было обнаружено свинца 79,8%, а, согласно теоретическим расчетам, его содержится 85,9%, что вполне согласуется с предложенной структурой.

Такой подход позволил нам показать локализацию продукта реакции на гидролазу на экзоцеллюлярных компонентах дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* при росте на ХМС в качестве источника азота (рис. 2Б). Для выяснения универсальности этого подхода были воспроизведены ранее описанные нами электронно-цитохимические реакции, в которых в качестве субстратов вместо твинов был использован ХМС. Была подтверждена локализация липазы на экзоцеллюлярных компонентах липолитически активных дрожжей *Candida lipolytica* (рис. 2В и гидролазы у дрожжей - деструкторов поверхностно-активного вещества лаурокс-9

*Cryptococcus humicolus* (рис. 2Г) и при этом по интенсивности отложения продукта реакция превосходила реакцию с твинами (рис. 2А).

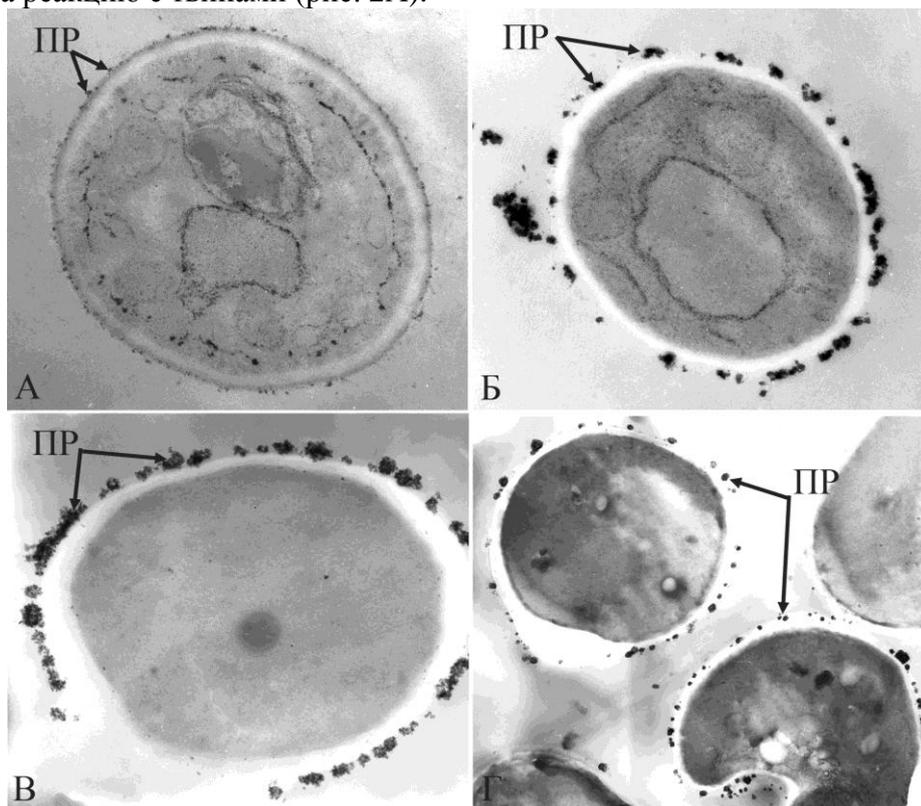


Рис 2. Электронно-микроскопическая цитохимическая реакция на гидролазы. Без дополнительного контрастирования. А. *Rhodotorula mucilaginosa*. Реакция на гидролазы ХМС. Субстрат - ПАВ; Б. *Candida lipolytica*. Реакция на липазу. Субстрат – ХМС; В. *Cryptococcus humicolus*. Реакция на гидролазы ПАВ. Субстрат ХМС; Г. *Rhodotorula mucilaginosa*. Реакция на гидролазы ХМС. Субстрат - ХМС. ПР – продукт цитохимической реакции, образующий электронно-плотный комплекс при связывании с ионами свинца.

Таким образом, на основании изложенного, авторы рекомендуют использовать 1-хлорметилсилатран в качестве субстрата для электронномикроскопического выявления неспецифических гидролаз на экзоцеллюлярных структурах у микроорганизмов.

#### Литература

1. Nagata T. Electron Microscopy of Enzymes. V. Principles and Methods / Ed. M.A Nayat New York: Van Nostrand Reinold Co., 1974, P. 132.

### **Активация серинового цикла у *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z при росте на метаноле**

*Егорова С. В., Бум С. Ю.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
bohemanrhapsody12345@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_82-84

Метанотрофы – специализированная группа бактерий, использующих метан или метанол в качестве единственных источников углерода и энергии. Метанотрофы

получают энергию, окисляя метан до  $\text{CO}_2$ , и ассимилируют углерод на уровне промежуточных продуктов – формальдегида, формиата, а также  $\text{CO}_2$ , в трех биохимических путях. Считается, что метанотрофы, относящиеся к *Gamma*proteobacteria (I тип), используют рибулозомонофосфатный (РМФ) путь, в котором С-С связь образуется за счет конденсации формальдегида и рибулозо-5-фосфата. Метанотрофы класса *Alphaproteobacteria* (II тип) ассимилируют С1-соединения через сериновый цикл, где в отличие от других метаболических путей, основными метаболитами являются аминокислоты и органические кислоты. Геномный анализ выявил присутствие у всех гаммапротеобактериальных метанотрофов гены, кодирующие ферменты серинового цикла. При этом роль данного метаболического пути у бактерий, реализующих в качестве основного варианта С1-ассимиляции РМФ-путь, остается неясным.

Основной задачей данной работы является определение функций серинового цикла у гаммапротеобактериальных метанотрофов. В качестве объекта исследования использовался облигатный метанотроф *Methylovulumicrobium alcaliphilum* 20Z, являющийся модельным организмом для изучения метанотрофного метаболизма. У данного штамма были определены активности ключевых ферментов серинового пути (сериноглиоксилатаминотрансферазы, гидроксипируватредуктазы, глицераткиназы и малил-КоА лиазы) и уровни экспрессии ряда генов центрального и С1-метаболизма, а также их зависимость от условий выращивания.

Для определения потока углерода через сериновый цикл проводили сравнение активностей ключевых генов этого пути у *M. alcaliphilum* 20Z, растущего на различных субстратах: на метане, метаноле, а также на смеси метана и метанола. Клетки последовательно выращивали сначала на метане, по достижении экспоненциальной фазы в среду добавляли метанол 0,2% (об/об), а по истечении 18 ч инкубации клетки разрушали и в бесклеточных экстрактах измеряли активности ферментов. В ходе эксперимента выявлено 4-х кратное возрастание активности гидроксипируватредуктазы в клетках, выращенных на метаноле и смеси метана и метанола, по сравнению с ростом на метане (Рис.1). При этом активность сериноглиоксилатаминотрансферазы увеличивалась незначительно.

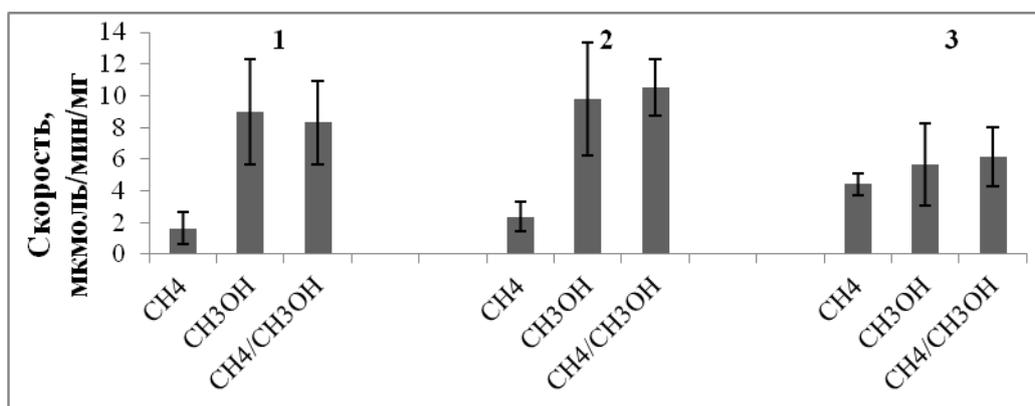


Рис.1. Активность гидроксипируватредуктазы (1,2) и сериноглиоксилат-аминотрансферазы (3) у *M. alcaliphilum* 20Z при росте на разных субстратах.

Активность гидроксипируватредуктазы измеряли с НАДН (1) или НАДФН (2).

Ранее нами было предположено, что регуляция серинового цикла у данного метанотрофа происходит на уровне гидроксипируватредуктазы [1,2]. Полученные экспериментальные данные подтверждают выдвинутое предположение.

Изменение уровня экспрессии генов *sga*, *gck* и *mcl*, кодирующих соответственно ферменты серинового пути серинглиоксилатаминотрансферазу, глицераткиназу и малил-КоА лиазу, определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Из клеток, выращенных на метане, метаноле или смеси метан/метанол выделяли РНК методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции. Уровень транскрипции генов серинового пути оценивали относительно уровня транскрипции гена *rpoB*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу РНК полимеразы. Уровень транскрипции каждого гена в клетках, растущих на метане, принимали за 1. В клетках, выращенных на метаноле и смеси метана и метанола, обнаружено повышение уровня транскрипции генов глицераткиназы и малил-КоА лиазы, тогда как экспрессия серинглиоксилатаминотрансферазы уменьшалась в клетках, растущих на смеси метана и метанола (Рис. 2). Повышение уровня экспрессии глицераткиназы и малил-КоА лиазы при росте в присутствии метанола может означать активацию серинового цикла как дополнительного РМФ-циклу ассимиляционного пути в условиях избытка источника углерода, по сравнению с ростом на метане ввиду его ограниченной растворимости. Отсутствие закономерности в экспрессии серинглиоксилатаминотрансферазы может быть обусловлено наличием у метанотрофа неспецифических аминотрансфераз, которые используют глиоксилат в качестве акцептора аминогруппы.

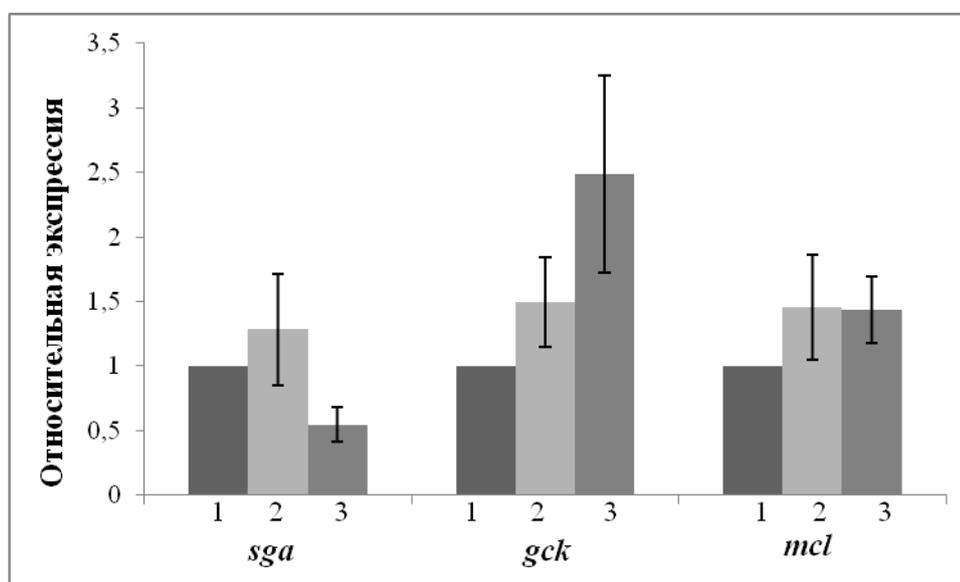


Рис.2. Уровни экспрессии генов *sga*, *gck* и *mcl* у *M. alcaliphilum* 20Z, выращенного на различных субстратах: 1 – метан, 2 – метанол, 3 – смесь метана и метанола.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01113

#### Литература

1. Бут С.Ю., Егорова С.В., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Биохимические свойства и филогения гидроксипируватредуктаз метанотрофных бактерий, реализующих различные пути C1-ассимиляции // Биохимия. 2017. Т. 82. № 10. С. 1647-1656.
2. S.Y. But, S.V. Egorova, V.N. Khmelenina, Y.A. Trotsenko. Serine-glyoxylate aminotranferases from methanotrophs using different C1-assimilation pathways // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. Volume 112:741–751.

# Влияние АЦК-дезаминазной активности на конкурентоспособность эпифитного симбионта растений *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831

Екимова Г.А., Агафонова Н.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)  
г. Пушкино; ekimova\_g@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_85-86

Изучение микробно-растительных взаимодействий — одно из быстро развивающихся направлений в современной биологии. Ранее исследования микрофлоры растений в основном были связаны с почвенными и ризосферными микроорганизмами-симбионтами растений. В настоящее время все больше внимания уделяется эпифитным микроорганизмам филлосферы (Vorholt, 2012). Постоянными ее обитателями филлосферы являются аэробные метилотрофные бактерии, использующие окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. Для них характерно чрезвычайное разнообразие заселяемых растений, что говорит о многочисленности экологических стратегий, реализуемых данными бактериями, а также их широких адаптационных возможностях. Особую роль в фитосимбиозе занимает способность бактерий к деградации 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) — предшественника в биосинтезе этилена. Этилен является одним из основных фитогормонов, сверхпродукция которого приводит к запуску программы старения растений, опаданию листьев и созреванию плодов. Соответственно, бактерии, обладающие ферментом АЦК-дезаминазой, могут использовать АЦК в качестве дополнительного источника углерода и энергии при этом способствуя задержке старения и повышению устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям (Glick, 2013).

При помощи гомологичной рекомбинации был получен мутант *Methylobacterium radiotolerans* с делецией в гене АЦК-дезаминазы (*acdS*). Он был комплементирован как исходным вектором p7A-29, служившим отрицательным контролем, так и плазмидой p7A-36 несущей нокаутированный ген. Мутантов и их комплементированные варианты тестировали на наличие АЦК-дезаминазной активности при росте либо в присутствии, либо без индуктора — 2-аминоизобутирата, аналога АЦК. Штамм *M. radiotolerans*  $\Delta$ *acdS* не обладал активностью АЦК-дезаминазы как с индуктором, так и без него, в отличие от исходного штамма, в котором активность фермента проявлялась в присутствии индуктора. Комплементированный исходным вектором мутант  $\Delta$ *acdS*/p7A-29 не обладал активностью АЦК-дезаминазы, аналогично бесплазмидному мутанту. Комплементированный мутант  $\Delta$ *acdS*/p7A-36 проявлял очень высокую ферментативную активность независимо от индуктора, так как ген *acdS* в нём находится под контролем сильного конститутивного промотора метанолдегидрогеназы *mxhF*.

В дикие штаммы, делеционных мутантов, а также их комплементированные варианты был введен ген *gfp* под контролем промоторов  $P_{mxhF}$  с помощью вектора pUC18T-mini-Tn7T (Choi et al., 2005), в котором клонировали искусственный оперон, содержащий ген *gfp* под контролем промотора метанолдегидрогеназы. Вектор pUC18T-mini-Tn7T содержит минитранспозон Tn7, интегрирующийся в хромосому Грам-отрицательных бактерий в специфический сайт рядом с геном *glmS*, кодирующего глюкозамин-синтетазу. Транспозиция исключает элиминацию ДНК, содержащей ген *gfp* из клеток в отсутствие селективного давления.

Оценку конкурентоспособности различных штаммов *M. radiotolerans* проводили при росте в жидкой среде с метанолом и АЦК в качестве дополнительного источника

углерода/азота и единственного источника азота. Мутант, не способный к синтезу АЦК-дезаминазы, штамм дикого типа, а также сверх-продуцент АЦК-дезаминазы, штамм комплементированный исходным вектором и их gfp-меченые варианты попарно были культивированы совместно в соотношении один к одному. Далее путем серийных разведений и высева на агаризованную среду в ходе роста культуры было определено соотношение светящихся в УФ-излучении колоний к несветящимся. Показано, что наибольшим преимуществом над другими, в том числе штаммом дикого типа обладал комплементированный мутант с повышенным синтезом АЦК-дезаминазы. Между штаммами *ΔacdS/p7A-36* и JCM2831 в отсутствие других источников азота наблюдался наибольший разрыв в соотношении числа КОЕ (2,53:1), при этом мутант с делецией в гене *acdS* был не способен к росту на этой среде. В контроле штамм *ΔacdS/p7A-36* также превалировал, но незначительно. Следует отметить, что в клетках комплементированного мутанта ген *acdS* находится под контролем промотора метанолдегидрогеназы и синтезируется конститутивно, что значительно ускоряет потребление АЦК в случае ее появления.

Для микроорганизмов растения являются средой обитания, которая заселяется на конкурентной основе, благодаря мобилизации адаптивных возможностей, выработанных в процессе эволюции. Полученные в экспериментах с мутантами *in vitro* данные указывают на то, что АЦК-дезаминазная активность является значимым конкурентным преимуществом бактерий для роста в меняющихся условиях и при возможном дефиците питательных веществ. С помощью gfp-меченых штаммов возможно проведение в дальнейшем длительные экспериментов *in vivo* на растениях.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00998 мол\_а*

#### Литература

1. Choi K.-H., Gaynor J.B., White K.G., Lopez C., Bosio C.M., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system // Nat. Meth. 2005. V. 2. P. 443-448.
2. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // Nat. Rev. Microbiol. 2012. V. 10. № 12. P. 828–840.
3. Glick B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // Microbiological research. – 2014. – Т. 169. – №. 1. – С. 30-39.

### **Генетическая идентификация сибирезвенного штамма выделенного из нефтезагрязненного многолетнемерзлого грунта**

*Ерофеевская Л.А.*

Институт проблем нефти и газа Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения РАН», г. Якутск;  
lora-07.65@mail.ru

Из многолетнемерзлого грунта, отобранного на территории аварийного разлива нефти, на ряду с многообразием почвенной микрофлоры, выделен возбудитель сибирской язвы.

На твердых питательных средах штамм формирует не типичные для данного вида колонии S-формы. На поверхности скошенного мясо-пептонного агара растет в виде

нежного блестящего налета белого оттенка, что также не типично для *Bacillus anthracis*. В мясопептонном бульоне образует мутнообразный осадок. Интервал температурного роста для данного штамма соответствует +16...+37<sup>0</sup> С; оптимум роста +35...+37<sup>0</sup> С; предпочитаемая рН среда – 7,2-7,4 усл.ед. Из факторов патогенности вырабатывает гемолизин. Способен к росту, как в аэробных условиях, так и в анаэробных. Из сахаров ферментирует сорбит с образованием кислоты и газа.

При идентификации только с использованием стандартных микробиологических тестов могут возникнуть трудности. Так, например, идентификация близкородственных видов на основании физиолого-биохимических свойств затруднена вследствие общности свойств [1].

Для более точной идентификации в настоящей работе использовали молекулярно-генетические методы. Ген 16S рРНК амплифицировали с универсальными эубактериальными праймерами 27f (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') [2,3]. ПЦР проводили на приборе GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США).

Определение родовой принадлежности штамма проводили с использованием технических возможностей сайта EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) [4].

Полученная нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма представлена в виде цепочки:

CATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG  
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGСТААТАССGGАТААСАТТТТGAАССGCATGGТТCGAAАТТGAAAGGCGGCTTСG  
GCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
ССАAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA  
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAАCTCTG  
TTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACСТААС  
CAGAAAGCCACGGСТААСТACGTGCCAGCAGCCGCGGТААТАСGTAGGTGGCAAGC  
GTTATCCGGAATTATTGGGCGТААAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTТАAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA  
ССAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGТААСТGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG  
TGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATТАAGCACTCCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTТААТTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC  
CTCTGACAACCСТАGAGATAGGGCTTCTCCTTCGG

В таблице 2 представлены данные о генетической последовательности исследуемых образцов и их процентная достоверность.

Табл. 2 – Результаты идентификации нуклеотидной последовательности

Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/ Total nt
<i>Bacillus anthracis</i>	ATCC 14578(T)	Cohn 1872	AB190217	100.00	0/966
<i>Bacillus anthracis</i>	Ames	Cohn 1872	AE016879	99.90	1/990
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579(T)	Frankland and Frankland 1887	AE016877	99.90	1/990

<i>Bacillus pseudomycooides</i>	DSM 12442(T)	Nakamura 1998	ACMX01000133	99.60	4/990
<i>Bacillus mycooides</i>	ATCC 6462(T)	Flügge 1886	AF155956	99.60	4/990
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792(T)	Berliner 1915	ACNF01000156	99.49	5/990
<i>Bacillus mycooides</i>	DSM 2048(T)	Flügge 1886	ACMU01000002	99.19	8/990
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	WSBC 10204(T)	Lechner et al. 1998	Z84578	99.09	9/989
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KBAB4	Lechner et al. 1998	CP000903	98.99	10/990
<i>Bacillus gaemokensis</i>	BL3-6 KCTC 13318(T)	Jung et al. 2010	FJ416489	98.72	12/937
<i>Bacillus manliponensis</i>	BL4-6(T)	Jung et al. 2011	FJ416490	97.84	21/972

Таким образом, по современной таксономической классификации полученный штамм входит в домен *Bacteria*, тип *Firmicutes*, класс *Bacilli*, порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*, род *Bacillus*, вид *B. anthracis*.

**Автор благодарен за помощь в исследованиях руководителю Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН, д.б.н. Людмиле Ивановне. Евтушенко.**

*Работа выполнена в рамках проекта РФФИ по теме 18-45-140009 (договор № 7118 от 22.11.18 г.)*

#### Литература

1. Джобулаева А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Байкара Б.Т., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8-1. – С. 63-67.
2. Lane, D. J. 16/23S sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics /Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: Wiley. – 1991.– P. 115-175.
3. Medlin L., Elwood H. J., Stickel S., Sogin M. L. The characterisation of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions // Gene. – 1998. – V. 71. – P. 491-499.
4. Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species // Int J Syst Evol Microbiol. 2012. – P. 716–721.

## Адгезия и биопленки нетуберкулезных микобактерий

Ерошенко Д.В., Попова И.В., Полюдова Т.В.

«ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, dasha.eroshenko@gmail.com

Были проведены исследования адгезионных свойств нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) на примере трех коллекционных штаммов: *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. smegmatis* ГИСК 607 и *M. avium* ГИСК 168. При оценке адгезии микобактерий выращенных на жидких питательных средах Middlebrook 7H9 в присутствии твина 80, к различным поверхностям, мы оценивали степень их сродства к н-гексадекану (Microbial Adherence to Hydrocarbon – МАТН-тест) и твердой поверхности полистирола (табл.).

Таблица – Адгезионные свойства НТМБ

Штамм	Процент гидрофобности клеток, %	Количество отдельных клеток в поле зрения	Количество коагрегатов клеток (Ø более 20 мкм) в поле зрения
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	61,0	31±6,5	0,13±0,03
<i>M. smegmatis</i> ГИСК 607	80,0	35±6,8	5±1,5
<i>M. avium</i> ГИСК 168	86,0	9±3,2	6±2,0

Бактерии *M. avium* ГИСК 168 и *M. smegmatis* ГИСК 607 обладали более высоким уровнем сродства к гидрофобному растворителю н-гексадекану по сравнению с *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Невероятная способность микобактерий к коагрегации явилась причиной выявления незначительного количества отдельных клеток адгезированных на твердой поверхности. Бактерии *M. avium* ГИСК 168 и *M. smegmatis* ГИСК 607 образовывали мощные агломераты, которые хорошо адгезировались к поверхности полистирола.

При проведении сравнительной оценка способности НТМБ к образованию разных типов биопленок при росте в жидких питательных средах (Middlebrook 7H9, 5 сут, 37°C) было обнаружено, что в каждой культуре формировались 3 субпопуляции: бактерии, сосредоточенные в плавающей на поверхности питательной среды биопленке, планктонная культура (бактериальная масса, находящаяся в толще жидкой питательной среды) и прикрепленные ко дну полистироловой чашки Петри бактерии, формирующие придонную биопленку. Биомасса каждой субпопуляции клеток существенно различалась. Так, при росте на жидкой среде Middlebrook 7H9 без добавления твина через 5 суток культивирования бактерии, главным образом, были сосредоточены в придонной и плавающей биопленках, при этом в планктонной культуре количество биомассы незначительно. (Рис. 1).

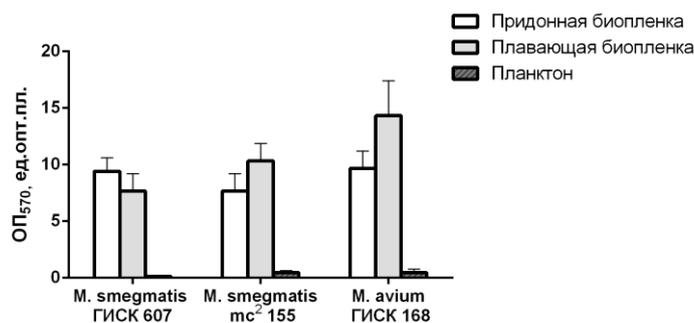


Рис. 1 Соотношение разных типов биопленок НТМБ *M. smegmatis* ГИСК 607, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 и *M. avium* ГИСК 168 при культивировании на жидкой среде Middlbrook 7Н9.

Для оценки влияния состава питательной среды на распределение бактериальных клеток НТМБ между различными типами биопленок мы использовали разные по составу среды: LB (дрожжевой экстракт – 5 г, триптон – 10 г, KCl – 6,4 г на 1 л), среду с лактатом натрия (дрожжевой экстракт – 10 г, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 1 г, Na<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub>×2Н<sub>2</sub>O – 3 г, лактат натрия (70%) – 40 мл на 1 л), среду Сотона (L-аспарагин – 4 г, лимонная кислота – 2 г, K<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub>×3Н<sub>2</sub>O – 0,65 г, MgSO<sub>4</sub>×7Н<sub>2</sub>O – 0,5 г, тритон X-100 – 0,05 г, глицерол – 40 мл на 1 л) и среду М63 с одним источником углерода и энергии (KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 6,8 г, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 10 г, FeSO<sub>4</sub>×7Н<sub>2</sub>O – 0,025 г, MgSO<sub>4</sub>×7Н<sub>2</sub>O – 0,24 г, 20%-й раствор глицерина – 10 мл на 1 л). Показано, что биомасса каждой субпопуляции клеток существенно различалась на разных питательных средах (рис. 2). Так, через 5 суток культивирования выявлено, что бактерии всех исследованных штаммов микобактерий на среде LB сосредоточены, главным образом, в придонной биопленке и, частично в планктоне. Среда с лактатом натрия способствовала формированию биопленок микобактерий как на твердой, так и на жидкой поверхностях, при этом планктонные клетки практически не выявлялись. На среде Сотона биомасса распределялась равномерно во всех субпопуляциях, некоторое снижение биомассы наблюдалось в планктонной культуре. На питательной среде М63, биомасса микобактерий была сосредоточена преимущественно в придонной биопленке.

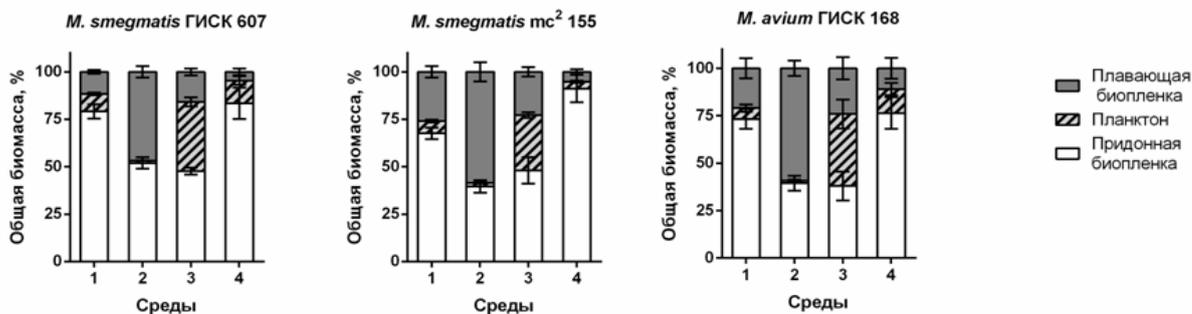


Рис. 2 Биомасса субпопуляций НТМБ, выращенных на разных питательных средах в течение 5 суток. 1 – среда LB, 2 – среда с лактатом натрия, 3 – среда Сотона, 4 – среда М63.

Таким образом, нами выявлена способность микобактерий изученных нами штаммов к формированию различных типов биопленок на границах раздела фаз в условиях *in vitro*. Однако, несмотря на различия в адгезионных характеристиках и интенсивности биопленкообразования среди трех штаммов НТМБ, характер и тип биопленки во многом зависел от состава питательной среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №18-34-00333\_мол-а.

## Чувствительность к ципрофлоксацину бактерий *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 дикого типа и мутантов с делецией генов токсин-антитоксин системы

Ерошенко Д.В., Полюдова Т.В., Пьянкова А.В.

«ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь; dasha.eroshenko@gmail.com

Методом двукратных разведений в агаризованной питательной среде исследована чувствительность *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 бактерий дикого штамма и мутантного по генам токсин-антитоксин (ТА) системы к фторхинолону II поколения ципрофлоксацину. Объектом исследования явились бактерии, геном которых содержит три «классических» локуса ТА систем: *VapBC*, *MazEF* и *Phd/Doc*. В настоящее время показано, что эти ТА системы отвечают за адаптацию бактерий в тех или иных стрессовых ситуациях, например, запуск процесса программируемой клеточной смерти и формирование «покоящихся» форм бактериальных клеток. Также были исследованы бактерии *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 с делецией локусов двух ТА систем *VapBC* и *MazEF* ( $\Delta vapBC \times \Delta mazEF$ ), любезно предоставленные к.б.н. А.В. Гончаренко (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва) [1]. Наличие мутации было подтверждено ПЦР-анализом указанных генов (Рис. 1).

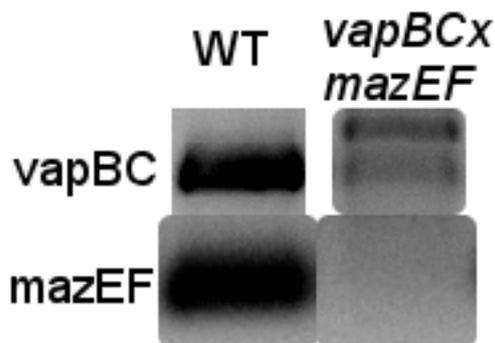


Рис. 1 Бактерии *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (wt) и с делецией локусов *VapBC* и *MazEF* ( $\Delta vapBC \times \Delta mazEF$ )

При исследовании чувствительности к ципрофлоксацину дискодиффузионным методом (5 мкг на диске «НИЦФ»), диаметр зоны задержки роста составил 40 мм для бактерий обоих штаммов. При внесении антибиотика в плотную питательную среду Middelbrook 7H11 («HiMedia») минимальная ингибирующая концентрация ципрофлоксацина составляла 0,5 мкг/мл. При этом в местах нанесения ряда аликвот культуры мутантного штамма через 5 суток инкубации при 37°C выявлялись единичные колонии бактерий, устойчивых к ципрофлоксацину (0,5 мкг/мл) (Рис. 2). Это позволяет обозначить данную дозу ципрофлоксацина, как концентрацию, способствующую селекции мутантов, а дозу 1 мкг/мл, как концентрацию, предупреждающую развитие мутантов (Mutant prevention concentration (MPC)[2]) для штамма с делецией генов ТА систем.

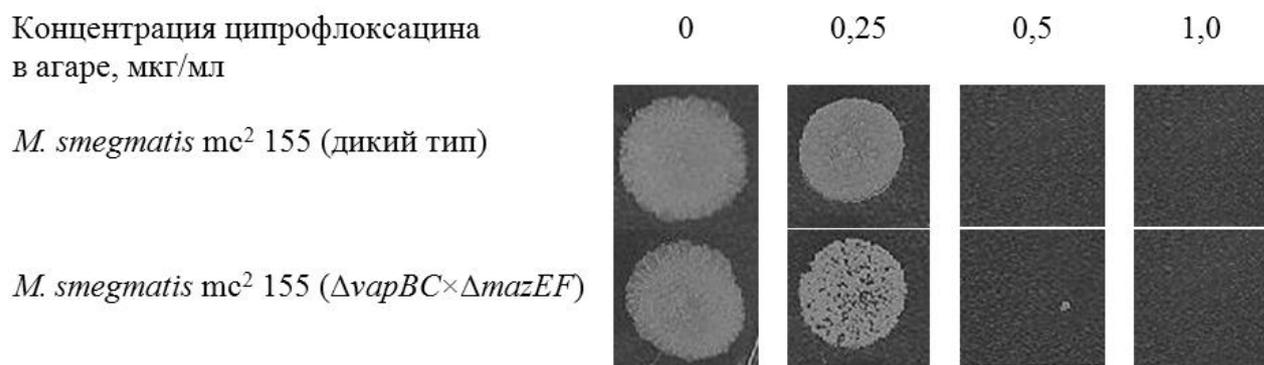


Рис. 2 Рост бактерий *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 на среде Middlbrook 7H11, содержащей ципрофлоксацин (нанесено 10<sup>6</sup> КОЕ/мл)

Бактерии дикого типа не формировали колоний на агаре, содержащем 0,5 мкг/мл ципрофлоксацина. Через 5 суток инкубации участки агара, содержащего 0,5 и 1 мкг/мл антибиотика, диаметром 8 мм, где наносили аликвоты культур, были стерильно вырезаны и помещены в жидкую среду Middlbrook 7H9. Инкубацию проводили в течение 7 суток при 37°C. На 5е сутки культивирования агаровых дисков с концентрацией антибиотика 0,5 мкг/мл наблюдался активный рост бактерий дикого типа в жидкой питательной среде. Выявленный факт может свидетельствовать о переходе бактерий *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 в покоящееся состояние в присутствии антибиотика. В оптимальных условиях микобактерии возобновляли свой рост. При переносе участков агара, содержащего 1 мкг/мл антибиотика с аликвотами культур не был выявлен рост бактерий на жидкой питательной среде. Рост *M. megmatis* mc<sup>2</sup> 155 с делецией локусов ТА систем не был выявлен при переносе участков агаризованной среды с обеими концентрациями антибиотика.

Таким образом, наличие ТА систем позволяет бактериям *M. megmatis* mc<sup>2</sup> 155 уходить в покоящееся состояние, возобновляя свой рост в оптимальных условиях. Бактерии с делецией генов ТА систем *VapBC* и *MazEF* не перешли в состояние покоя и ципрофлоксацин в концентрации 0,5 мкг/мл оказал на них бактерицидное действие, однако были выявлены устойчивые к нему мутанты, составляющие 0,0001% исходной культуры.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №18-34-00333\_мол-а.*

#### Литература

1. Demidenok O.I., Kaprelyants A.S., Goncharenko A.V. Toxin-antitoxin *vapBC* locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*. FEMS microbiology letters. 2014.V.352. №1. P.69-77.
2. Gianvecchio C., Lozano N., Henderson C., et al. Variation in mutant prevention concentration. Frontiers in Microbiology. 2019. V.10. P.1-9.

## Продукция вторичных метаболитов у мицелиальных грибов: роль полиаминов

Жгун А. А.

ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии, г. Москва; zzhgun@mail.ru

Мицелиальные грибы (плесневые грибы, или плесень) – таксономически-разнородная группа грибов, включающая представителей *Zygomycota* и *Ascomycota*, способных образовывать мицелиальные гифы и конидии. Ранее большинство плесневых грибов относили к *Deuteromycota*. В настоящее время описано около 80 тысяч видов плесневых грибов; предполагается, что их существует свыше 1 млн. Характерная особенность многих представителей этой группы связана с присутствием необычных и/или уникальных биохимических путей. Некоторые продукты, получаемые в результате функционирования этих путей (в особенности, путей вторичного метаболизма), имеют важное фармацевтическое значение, например - антибиотики, статины, иммунодепрессанты. В природе многие вторичные метаболиты (или, натуральные продукты) синтезируются в ответ на те, или иные внешние воздействия. Например, в условиях ограниченных пищевых ресурсов в окружающую среду могут секретироваться антибиотики, значительно повышающие конкурентоспособность этих организмов за субстрат. При этом в норме подавляющее число вторичных метаболитов не продуцируется. Отдельные представители способны в тех или иных условиях производить до 100-та и более вторичных метаболитов. Молекулярные основы их биосинтеза у мицелиальных грибов связаны с работой так называемых «кластеров генов вторичного метаболизма». Гены, необходимые для биосинтеза этих низкомолекулярных соединений, их транспорта между компартментами клетки (где поэтапно реализуются пути вторичного метаболизма), защиты самого организма от получаемых высокоактивных соединений и путь-специфической регуляции их экспрессии, собраны в кластеры, находятся в одном хромосомном локусе и совместно регулируются. Такая композиция позволяет одновременно управлять экспрессией генов кластеров вторичного метаболизма в результате эпигенетических процессов ремоделирования хроматина. В норме большинство кластеров вторичного метаболизма находятся в гетерохроматиновых локусах различных хромосом мицелиальных грибов. Разнообразные сигналы внешних воздействий сводятся, в конечном счете, к переходу от гетеро- к эухроматину в зоне кластера генов вторичного целевого метаболизма. В результате запускаемой апрегуляции биосинтетических и транспортных генов происходит биосинтез и транспорт необходимого соединения, соответственно. За счет апрегуляции путь-специфических регуляторных генов происходит синхронизация, юстировка этих процессов. У многих представителей мицелиальных грибов насчитывается 50 и более кластеров генов вторичного метаболизма, причем, биологической активностью часто обладает не только конечный продукт пути, и его интермедиаты. В результате, различные воздействия могут приводить к появлению не одного, а целого спектра, продуктов, близких по своей структуре.

С середины 60-х годов 20-го века в многочисленных научно-исследовательских лабораториях и биотехнологических фирмах проводили улучшения различных природных штаммов мицелиальных грибов с целью создания высокоактивных продуцентов того или иного соединения. При этом основным методом являлся случайный мутагенез с последующей селекцией по целевому признаку. Для многих продуцентов удалось увеличить выход желаемого низкомолекулярного продукта при оптимальных условиях ферментации в 100-1000 и более раз. При этом получили штаммы, у которых максимально

снижен уровень примесных побочных продуктов [1,2]. В последние годы для некоторых созданных таким образом высокоактивных штаммов определены молекулярные основы повышения продукции [3]. У высокоактивных штаммов, как правило, наблюдается выраженная апрегуляция генов кластера целевого метаболизма. Повышение генной экспрессии биосинтетических генов достигает 100 и более раз [4,5]. Одновременно с этим обнаружены мутации в альтернативных кластерах вторичного метаболизма [3]. При этом для многих высокоактивных штаммов не обнаружено дупликаций в кластерах генов целевых вторичных метаболизмов [4,6]. Однако существуют показательные примеры, где наличие нескольких дублированных кластеров не приводит к значительному росту натурального продукта [7]. В этих случаях, по-видимому, не происходит «эффекта ускользания» от системы глобальной регуляции вторичного метаболизма; работает только только копия кластера генов целевого метаболизма. Наряду с этим показано, что возможно эффективное функционирование и одновременно нескольких копий бета-лактамового метаболизма в продуценте пенициллина G (штамм DS68530); при этом, в ходе случайного мутагенеза произошли мутации в генах глобальных регуляторов вторичного метаболизма, таких как, *laeA* и *velA* [8]. Возможно, уход от эпигенетической регуляции кластеров генов вторичного метаболизма, в сочетании с делециями в нецелевых кластерах, позволил создать промышленный высокоактивный штамм DS68530, у которого функционируют одновременно несколько одинаковых кластеров генов целевого метаболизма [8]. В настоящее время подавляющее большинство промышленных продуцентов для мицелиальных грибов получили методом случайного мутагенеза. Создаваемые генно-инженерные штаммы имеют пока фундаментальное, но не прикладное значение [9]. Сложность создания высокоактивных продуцентов направленными методами генной инженерии осложняется, в первую очередь, сложной синхронизированной системой регуляции, механизмы которой до конца не изучены. Эпигенетическая модель глобальной регуляции открывает возможность для новых важных прикладных работ.

Для грибных промышленных продуцентов, полученных классическими методами, к настоящему времени достигнут некий технологический предел: дальнейшие мутагенезы не приводят к увеличению продукции целевого метаболита. Однако в последние годы обнаружили, что экзогенное введение биогенных полиаминов (1,3-диаминопропан, спермидин) в процессе ферментации может повышать выход целевого вторичного метаболита даже в случае штаммов, уже достигнувших своего технологического предела. Впервые это продемонстрировали на высокоактивном продуценте пенициллина G [10]. Наши исследования также показали стимулирующее воздействие полиаминов на биосинтез ловастатина и цефалоспорина C у высокоактивных штаммов *Aspergillus terreus* и *Acremonium chrysogenum*, соответственно. Мы также показали, что стимулирующий эффект сопровождается апрегуляцией генов из кластеров этих вторичных метаболитов и апрегуляцией *laeA* [6,11]. *LaeA* представляет собой S-аденозилметионин-зависимую метилазу гистонов, действует эпигенетически, является фактором ремоделирования хроматина и служит глобальным регулятором вторичного метаболизма мицелиальных грибов. Известно, что *LaeA*, является положительным регулятором как для биосинтеза бета-лактамов, так и статинов. Увеличение экспрессии *laeA* в ответ на экзогенное введение полиаминов может служить важнейшим молекулярным основанием увеличения выхода целевых метаболитов в продуцентах цефалоспорина C и ловастатина.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173*

## Литература

1. Патент RU2426793 C12P35/06, C07D501/02, C12R1/75. Способ биосинтеза цефалоспорины С с использованием нового штамма *Acremonium chrysogenum* ВКМ F-4081D. 2011.
2. Патент RU 2261901. Штамм гриба *Aspergillus terreus* № 44-62 – продуцент ловастатина, промышленный способ выделения ловастатина и способ лактонизации статинов. 2005.
3. Terfehr D, Dahlmann TA, Kück U. Transcriptome analysis of the two unrelated fungal  $\beta$ -lactam producers *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*: Velvet-regulated genes are major targets during conventional strain improvement programs. *BMC Genomics*. 2017;18: 272. doi:10.1186/s12864-017-3663-0
4. Dumina M V, Zhgun AA, Novak MI, Domratcheva a G, Petukhov D V, Dzhavakhiya V V, et al. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and high-producing strains of *Acremonium chrysogenum*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30: 2933–41. doi:10.1007/s11274-014-1721-1
5. Zhgun AA, Dumina MV, Voinova TM, Dzhavakhiya VV, Eldarov MA. Role of acetyl-CoA Synthetase and LovE Regulator Protein of Polyketide Biosynthesis in Lovastatin Production by Wild-Type and Overproducing *Aspergillus terreus* Strains. *Appl Biochem Microbiol*. 2018;54: 188–197. doi:10.1134/S0003683818020138
6. Zhgun AA, Nuraeva GK, Dumina MV, Voinova TM, Dzhavakhiya VV, Eldarov MA. 1,3-Diaminopropane and spermidine upregulate lovastatin production and expression of lovastatin biosynthetic genes in *Aspergillus terreus* via *LaeA* regulation. *Appl Biochem Microbiol*. 2019;55: 244–255.
7. Ziemons S, Koutsantas K, Becker K, Dahlmann T, Kück U. Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC Biotechnol*. 2017;17: 16. doi:10.1186/s12896-017-0335-8
8. Salo O V, Ries M, Medema MH, Lankhorst PP, Vreeken RJ, Bovenberg RAL, et al. Genomic mutational analysis of the impact of the classical strain improvement program on  $\beta$ -lactam producing *Penicillium chrysogenum*. *BMC Genomics*. 2015;16: 937. doi:10.1186/s12864-015-2154-4
9. Awan AR, Blount BA, Bell DJ, Shaw WM, Ho JCH, McKiernan RM, et al. Biosynthesis of the antibiotic nonribosomal peptide penicillin in baker's yeast. *Nat Commun*. 2017;8: 15202. doi:10.1038/NCOMMS15202
10. Martín J, García-Estrada C, Kosalková K, Ullán R V, Albillos SM, Martín J-F. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the *laeA* regulator. *Fungal Genet Biol*. 2012;49: 1004–13. doi:10.1016/j.fgb.2012.10.001
11. Жгун А.А., Калинин С.Г., Новак М.И., Домрачева А.Г., Петухов Д.В., Джавахия В.В., Эльдаров М.А. БЮЭ. Влияние полиаминов на биосинтез антибиотика цефалоспорины С в штаммах *Acremonium chrysogenum*. *Известия вузов Прикладная химия и биотехнология*. 2015;14: 47–54.

### **Функциональная роль С-концевого домена гемолизина II *B.cereus***

<sup>1,2</sup>Замятина А.В., <sup>1,2</sup>Руденко Н.В., <sup>2</sup>Каратовская А.П., <sup>3</sup>Нагель А.С.,  
<sup>3</sup>Андреева-Ковалевская Ж.И., <sup>3</sup>Сиунов А.В., <sup>1,2</sup>Бровко Ф.А., <sup>3</sup>Солонин А.С.

<sup>1</sup> Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино,

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

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино; solonin.a.s@yandex.ru

*B. cereus* продуцирует различные экзобелки, в том числе деградирующие ферменты, токсины, которые способствуют вирулентности, и могут вызывать инфекционные заболевания. Среди цитолизин *B. cereus* выделяют: гемолизин I (цеолизин O), гемолизин II (HlyII), гемолизин III и гемолизин IV (CytK), которые имеют гомологичную структуру. Гемолизин II отличается от всех пороформирующих токсинов *B. cereus* наличием С-терминальной аминокислотной избыточности из 94 остатков (STD).

Атака мембран гемолизином II возможна при наличии возможности связываться с эукариотическими клетками. В таком взаимодействии могут принимать участие различные домены гемолизина II. Данная работа посвящена ответу на вопрос: "Взаимодействует ли STD с клеточными мембранами?" Создание панели моноклональных антител против этого домена в лаборатории иммунохимии ФИБХ РАН позволило ответить на этот вопрос. В работе использовали эритроциты кролика [1]. Для эксперимента по участию STD во взаимодействии с мембранами эритроцитов в составе иммунных комплексов после предварительной инкубации с биотинилированными моноклональными антителами использовали моноклональные антитела, сохраняющие способность эффективно связываться с STD после биотинилирования. Эритроциты добавляли после формирования иммунных комплексов. Инкубацию проводили при двух температурах – 20<sup>0</sup>С (RT) и 37<sup>0</sup>С в течение часа. Иммунные комплексы разрушали обработкой буфером рН 2,5 с последующей нейтрализацией. В качестве отрицательного контроля использовали биотинилированные нормальные иммуноглобулины мыши. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Антитела в лизатах выявляли методом иммуноферментного анализа по взаимодействию антител кролика с иммуноглобулинами мыши. Наличие антител в лизате свидетельствовало о взаимодействии STD в составе иммунных комплексов с мембранами эритроцитов. В условиях эксперимента при взаимодействии с эритроцитами STD переходил в олигомерные формы. Олигомеризацию также выявляли при взаимодействии с липосомами, позволяя заключить, что STD взаимодействует с мембранами. Результаты, полученные с участием эритроцитов и STD, представлены в виде диаграммы на рис. 2.

Моноклональные антитела взаимодействуют с уникальными антигенными детерминатами, что указывает на специфическое и ориентированное взаимодействие. Это взаимодействие наблюдали только с определенными антителами (HlyIIС 16 и HlyIIС23), эпитопы которых оказываются доступными в момент взаимодействия с эритроцитами и указывает на то, что взаимодействие не является случайным «налипанием». Таким образом, использование биотинилированных антител к STD позволило заключить, что гемолизин II обладает дополнительной функциональной активностью – адгезией к мембранам, а сам STD играет существенную роль в этом взаимодействии.

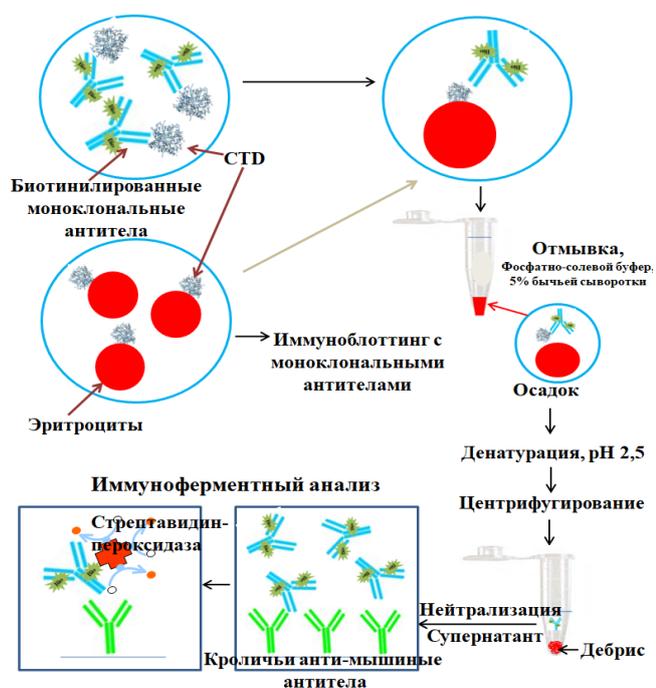


Рис.1. Взаимодействие СТД с кроличьими эритроцитами, иммуноферментный анализ. Схема эксперимента

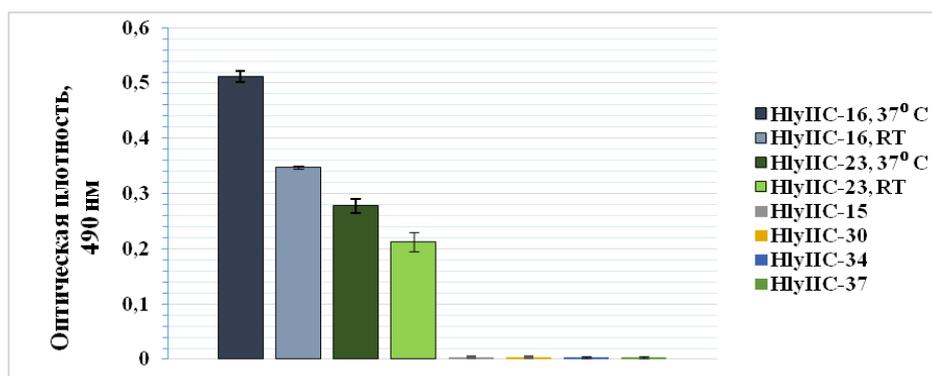


Рис.2. Относительное содержание биотинилированных моноклональных антител в лизатах эритроцитов после взаимодействия иммунных комплексов с СТД. Результаты представлены за вычетом фоновых значений в присутствии биотинилированных нормальных иммуноглобулинов мыши.

### Литература

1. Z.I. Andreeva, V.F. Nesterenko, I.S. Yurkov, Z.I. Budarina, E.V. Sineva, A.S. Solonin, Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II, *Protein Expr. Purif.* 47 (2006) 186–193. doi:10.1016/j.pep.2005.10.030.
2. Patiño-Navarrete R, Sanchis V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria // *Res. Microbiol.* 2017. V.168. P.309–318. doi:10.1016/j.resmic.2016.07.002.
3. Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. V.180. P.7–14. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x.

## Структурно-функциональные перестройки оболочки условно-патогенных дрожжей рода *Candida* при переходе в условия патогенеза

Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Фарофонова В.В., Мачулин А.В., Кулаковская Т.В.,  
Дмитриев В.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН);  
zvonarev@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_98-100

Среди дрожжей, способных эффективно утилизировать углеводороды нефти в качестве источника углерода, выявлены условно-патогенные виды: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* и *Candida krusei*, которые при определённых условиях являются патогенными. Обнаруживается очевидное сходство структурных признаков у дрожжей при росте на углеводородах, при голодании по углероду и у дрожжей в условиях патогенеза. Это гидрофобность клеточной поверхности, образование биоплёнки и ещё один важный фактор - в оболочке дрожжей при росте на углеводородах [1] и в оболочке дрожжей при патогенезе [2] формируются сходные в структурном отношении модифицированные участки оболочки – каналы. Также нами были выявлены каналы в клеточной стенке у углеводород-утилизирующих дрожжей в условия голодания по углероду, что позволило нам сделать предположение об универсальности подобных структур [3,4].

Структуры, подобные описанным выше, были обнаружены у *C. albicans* WO-1 выделенной из крови и легких пациента с иммуносупрессией [5]. В отличие от клеток, выращенных в лабораторных условиях, они имели псевдомицелиальную форму и имели каналы в стенке. Среднее количество каналов на клетку составляло 141 [2], что коррелирует с нашими данными о количестве каналов у углеводородутилизирующих дрожжей *C. maltosa* при углеродном голодании [3]. Важнейшим фактором патогенности, обеспечивающим деструкцию тканей человека, является секреция аспаргат протеаз, [6] которые, концентрируясь на терминальных окончаниях гиф, обеспечивают непосредственную инвазию *Candida spp.* в ткани человека. Отмечено, что патогенность *Candida spp.* является мультифакторной, а вирулентность определяется аспаргат протеазами. Авторы утверждают, что клетки *C. albicans* с каналами секретируют как минимум в 10 раз больше кислой протеазы и обладают большей адгезией и гидрофобностью при сравнении с клетками без каналов к субстрату при патогенезе. [2]

Нами была обнаружена секреция специфических белков в культуральную среду *C. maltosa* при росте на гексадекане, в том числе и аспаргат протеазы (Secreted aspartic protease 2).[7] В клеточной оболочке *C. albicans* и *C. tropicalis* при росте на гексадекане так же, как и у *C. maltosa*, нами были обнаружены каналы (Рис 1,2).

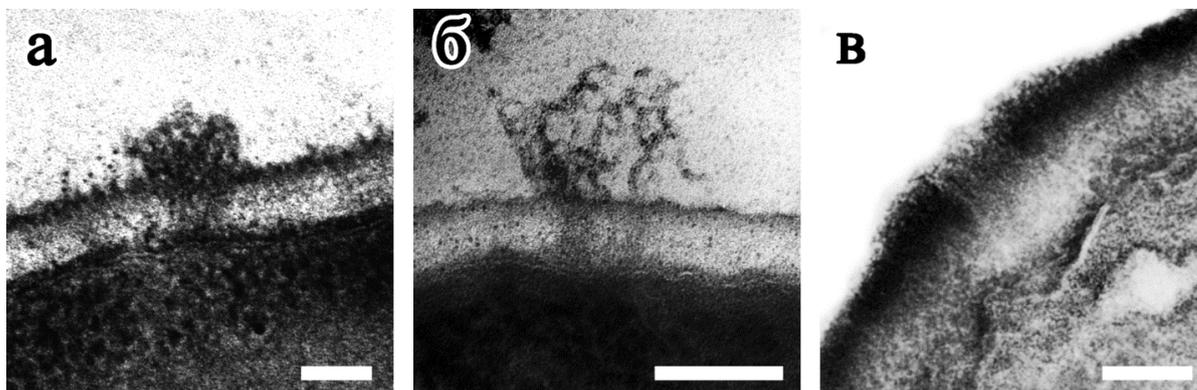


Рис 1. **а** – канал в стенке *C. maltosa* при росте на гексадекане; **б** - канал в стенке *C. tropicalis* при росте на гексадекане; **в** – канал в стенке *C. albicans* в условиях патогенеза - фотография из статьи Anderson J et al 1990 [2]). Метка **100 нм**.

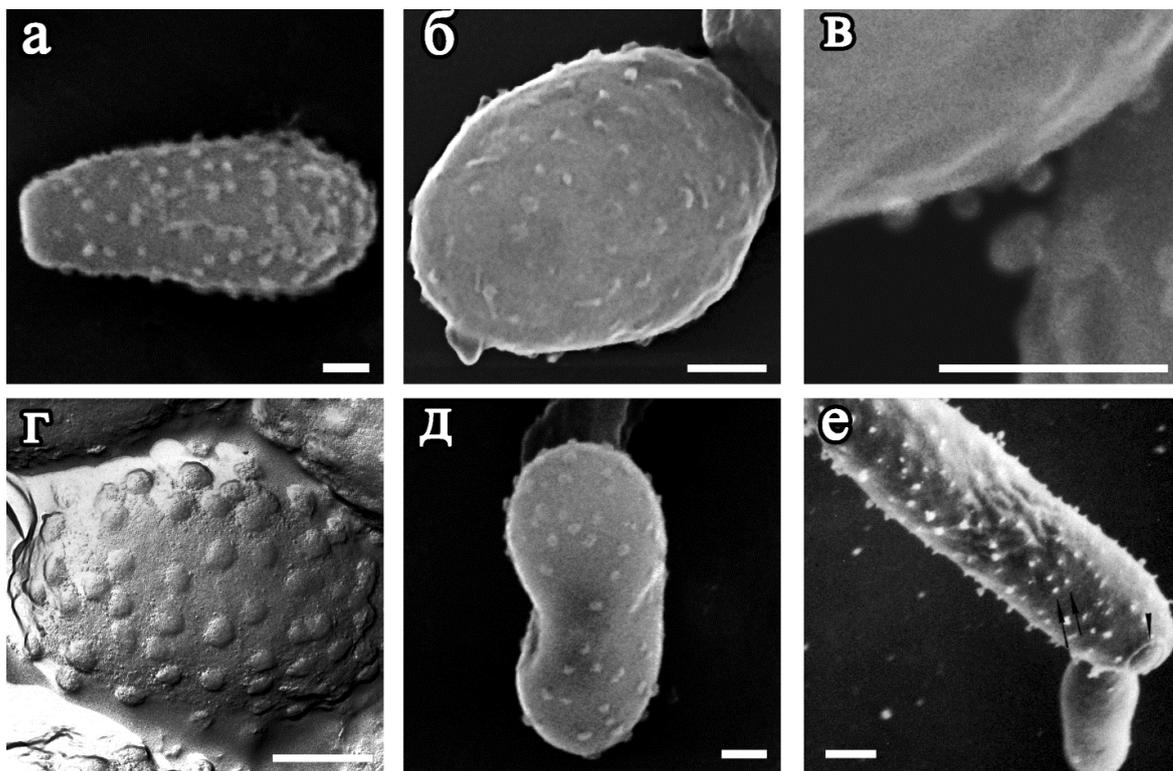


Рис. 2. **а** – каналы на поверхности *C. maltosa* при росте на гексадекане; **б, в** – каналы на поверхности *C. albicans* при росте на гексадекане; **г** - каналы на поверхности *C. tropicalis* при росте на гексадекане; **д** - каналы на поверхности *C. maltosa* при углеродном голодании; **е** – каналы на поверхности *C. albicans* в условиях патогенеза - фотография из статьи Anderson J et al 1990 [2].

Эти данные являются серьёзным аргументом в пользу сходных структурно–функциональных перестроек дрожжей при адаптации к росту на гидрофобных субстратах и переходу в патогенез.

Следовательно, возможность нейтрализации аспарат протеаз может стать эффективным инструментом антивирулентной терапии при кандидозах.

Обнаружение структур, подобных каналам, у дрожжей в условиях голодания и при попадании в условия, способствующие их переходу в патогенное состояние, позволило нам сделать предположение об универсальности каналов, функционирующих как матрица для иммобилизации секретируемых ферментов и других белков, необходимых дрожжевым клеткам при адгезии и инвазии в условиях патогенеза. В дальнейших исследованиях этой проблемы полученные данные могут служить хорошей основой для понимания механизмов перехода дрожжей в патогенное состояние.

#### Литература

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. Anderson J, Mihalik R, Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *J Bacteriol.* 1990 Jan;172(1):224-35.
3. 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. *Yeast.* – 2016. – 33(2). – P. 55-62.
4. Anton N. Zvonarev, David E. Crowley, Lubov P. Ryazanova, Lydia P. Lichko, Tatiana G. Rusakova, Tatiana V. Kulakovskaya, Vladimir V. Dmitriev. Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates *FEMS yeast research.* – 2017. – 17(3)
5. Anderson, J. M., & Soll, D. R. (1987). Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 169(12), 5579–5588.
6. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996; 7: 1: 55—69.
7. Extracellular proteins of *Candida maltosa* yeast grown on hexadecane. *The Cell Surface* – направлено в печать.

## **Эволюционный анализ структурных белков денсовирусов членистоногих**

<sup>1</sup>*Зимин А. А.,* <sup>2</sup>*Назипова Н.Н.,* <sup>3</sup>*Дроздов А.Л.*

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, Российская Федерация [zimin@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimin@ibpm.pushchino.ru)

<sup>2</sup>ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, г. Пушкино, Российская Федерация

<sup>3</sup>ННЦ МБ им. М.А.Жирмунского ДВО РАН, Российская Федерация, г. Владивосток,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_100-102

*Введение.* Одними из самых мелких вирусов являются денсовирусы и родственные им павовирусы. С эволюционной точки зрения структурные белки мелких вирусов могут содержать последовательности, являющиеся следами происхождения и эволюции первых вирусов. С этой точки зрения филогенетический анализ этих белков может дать представление о современной эволюции и изменчивости этих белков. Данные сведения могут помочь в корректном последующем выявлении основных консервативных мотивов этих белков. Одновременно такой анализ - это путь создания нового инструментария для понимания и преодоления денсовирусной и парвовирусной инфекции самых различных животных, а также человека. В число видов, страдающих от заболеваний денсовирусной инфекцией входят различные существенные животные и объекты аквакультуры. Это, например, шмели, пчелы, тутовый шелкопряд, морские ежи и морские огурцы, кукумария, тли, искодовые клещи, различные разноусые чешуекрылые и другие вредители сельскохозяйственных растений. *Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей структурных белков денсовирусов различных беспозвоночных.* В качестве маркерного белка был выбран структурный белок денсовируса морской звезды - SSaDV (1). После четвертой итерации программы сравнения PSI-BLAST (2) было найдено 87 гомологов при значении  $E < 3e-29$ . Для анализа филогении с помощью пакета программ Mega6 (3) был использован статистический метод UPGMA. Для статистического теста использовался Bootstrap method (4). Ранее мы использовали ряд методов для построения этого дерева и анализа устойчивости его ветвления. В этой работе мы остановились на вопросе укоренения дерева. Попытки укоренения дерева с помощью использования гомологов из группы парвовирусов человека, гуся и свиньи не дали результата (черные квадраты).

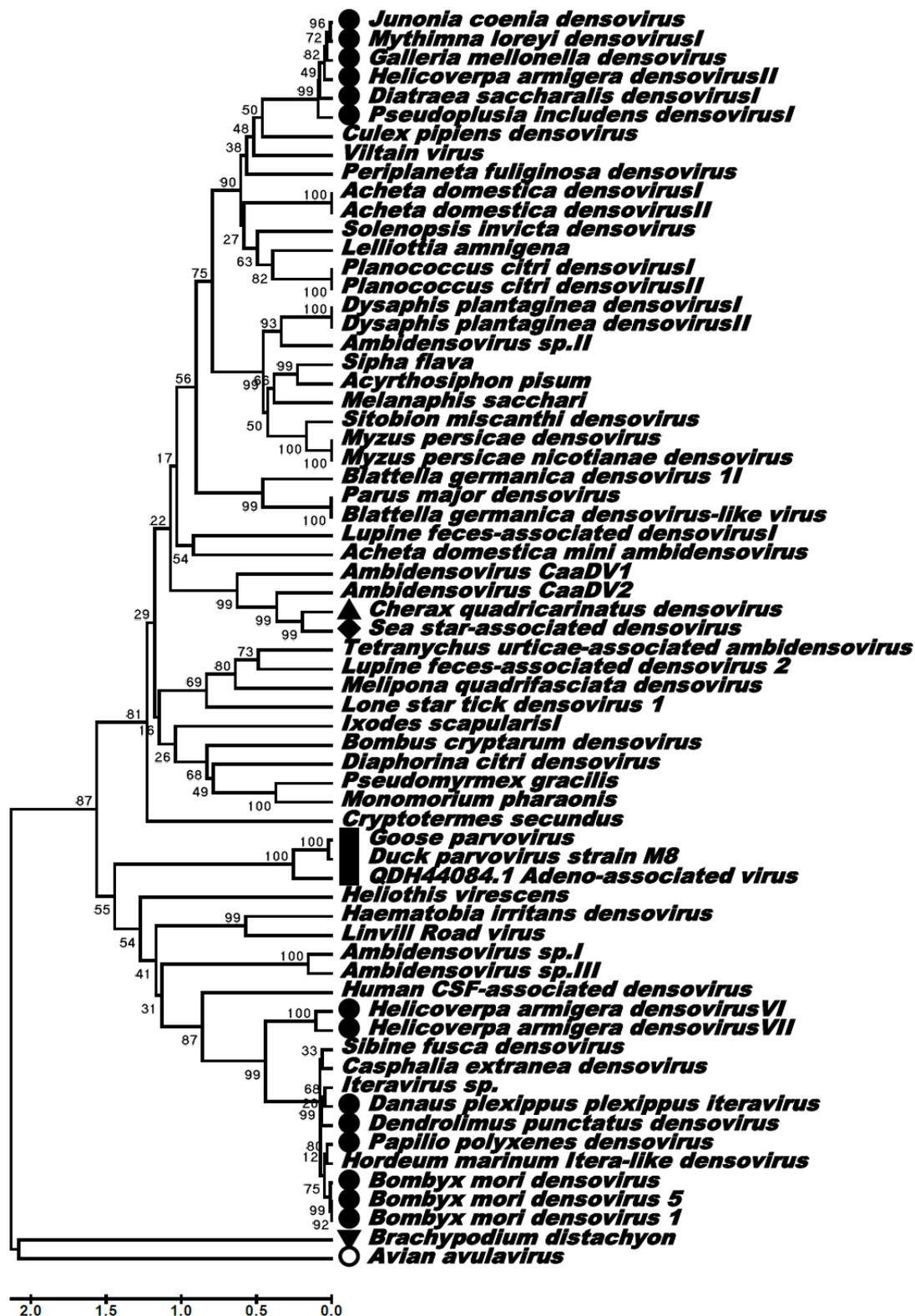


Рис. 1. Филогенетическое дерево структурных белков денсовирусов членистоногих.

Эти белки располагались в центре радиации при использовании, как метода максимального правдоподобия, так и других подходов. Было решено использовать сильно удаленную последовательность, но имеющую гомологию с структурными белками парвовирусов.

Среди РНК-вирусов была найдена последовательность белка слияния авуловируса птиц (*Avian avulavirus*) (кольцо). Дерево, полученное нами в данной работе (Рис.1.), имеет укоренение, так как последовательности авуловируса и денсовируса, как ни удивительно,

растения *Brachypodium distachyon* (треугольник, вершиной вниз) располагаются на отдельной ветви. Корень располагается между этими двумя ветвями. Белки вирусов различных чешуекрылых (черные кружки) разнесены на две родственные внутри, но сильно удаленные друг от друга группы последовательностей. Это говорит о том, что данные вирусы однозначно тяготеют к распространению на родственные виды членистоногих, но могут заражать и не родственные исходному хозяину виды. Расположение близко друг к другу белков вирусов морских звезд (ромб) и австралийского водного рака (треугольник вверх вершиной) может говорить о экологическом факторе в приобретении новых хозяев.

*Исследование поддержано РФФИ для Назиповой Н.Н. грантом №19-07-00996.*

#### Литература

1. Hewson, Ian; et al. Densovirus associated with sea-star wasting disease ... PNAS 2014, 111 (48): 17278–83.
2. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST... NAR, 1997. V. 25. P. 3389–3402.
3. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
4. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies.... Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
5. Jones D.T., et all. The rapid generation of mutation data matrices ... CAB, 1992. V. 8. P. 275–282.

### **Филогения геномов бактериофагов, модифицирующих иммунную систему кур**

<sup>1,2</sup>Зимин А. А., <sup>3</sup>Скобликов Н. Э., <sup>4</sup>Назипова Н. Н., <sup>1</sup>Василенко О. В.

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино; zimin@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования, Пушкинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино

<sup>3</sup>ФГБНУ "Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии", г. Краснодар

<sup>4</sup>Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института Прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, г. Пушкино

**Введение.** Сальмонеллез – основная причина пищевых отравлений в России [1]. Ряд сероваров сальмонелл могут колонизировать кишечный тракт кур. Мясо птицы и яйца могут быть пищевых токсикоинфекций. Поэтому решающее значение для снижения заболеваемости сальмонеллезом у людей имеет контроль этих штаммов сальмонелл при производстве птицы. Бактериофаги P22-типа модифицируют иммунный ответ у цыплят. Ранее было показано, что влияние бактериофага P22 на иммунный ответ происходит с участием макрофагов HD-11 [2]. При этом модификация иммунного ответа развивается как при внутриклеточном, так и межклеточном развитии *S. typhimurium* LT2. В этом исследовании оценивали иммунный ответ куриных макрофагов (HD-11) и различных влияний бактериофага P22 против вне- и внутриклеточного развития *S. typhimurium* LT2. Были проведены следующие опыты по экспериментальному заражению птицы *S. typhimurium* LT2. (1)

Были взяты HD-11 клетки в качестве контроля, (2) также HD-11 клетки в смеси с *S. typhimurium* LT2, (3) HD-11 клетки с *S. typhimurium* LT2 и P22, а также (4) HD-11 клетки с

P22. Уровень IL-8 измерялся с помощью ELISA. Кроме того, с помощью QRT-PCR были определены количественно уровни экспрессии генов еще четырех цитокинов (IL-4, IL-8, IL-10, и гамма-интерферона) в присутствии *S. typhimurium* LT2 и / или P22. Было показано, что бактериофаг P22 лизировал как вне-, так и внутриклеточные *S. typhimurium* LT2. В том числе было обнаружено, что происходит фаголизис бактериальных клеток, которые были сорбированы макрофагами птицы - HD-11. С помощью ELISA было выявлено, что макрофаги производят HD-11 в значительно большем количестве. Эти результаты коррелировали с количественным измерением уровня транскрипции соответствующего гена-регулятора [2].

**Задача исследования.** Было бы интересным охарактеризовать возможность использования других, родственных P22 бактериофагов для модификации и усиления иммунного ответа кур. Данная работа посвящена филогенетическому анализу опубликованных геномов бактериофагов, родственных P22, для оценки вариабельности этих бактериофагов в природе и выбора новых агентов для усиления клеточного иммунного ответа против сальмонелл у производственной птицы.

**Методы.** Кладистический анализ проведен с помощью метода Neighbor-Joining [4]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с помощью программы JSpecies v.1.2.1 [3]. Построение дерева было проведено с помощью пакета программ MEGA6 [5].

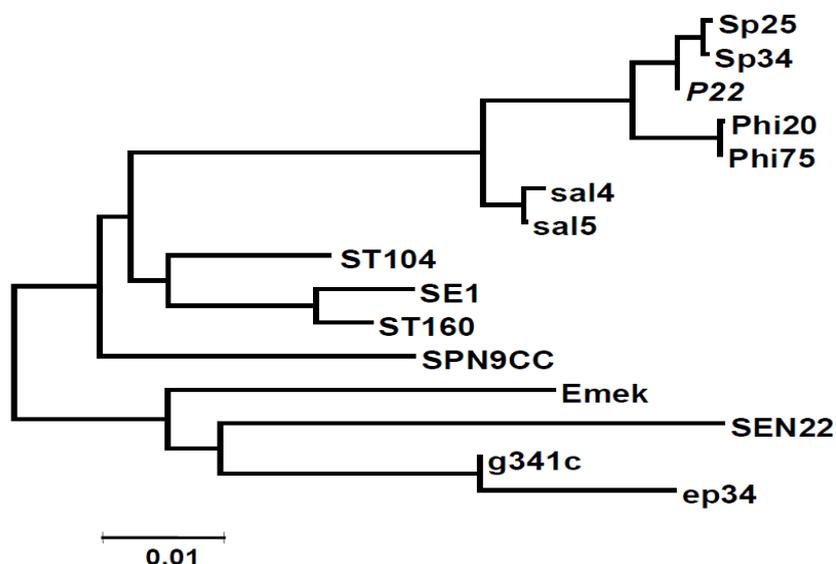


Рис. 1. Филогеномное дерево бактериофагов. Дерево построено на основе относительных межгеномных расстояний, вычисленных из таблицы ANIb. Не укоренено. Статистический метод Neighbor-Joining использовался в пакете MEGA6, средствами которого также выполнена графика. Фаг P22 – выделен курсивом.

Было проведено сравнение генома бактериофага P22 с таксономической группой геномов хвостатых бактериофагов из базы данных Genbank. Для дальнейшего анализа нами были отобраны из результатов работы программного средства BLASTp 15 геномов. P22 - TPA: Enterobacteria phage P22, Sp25 - Salmonella phage 25, Sp34 - Salmonella phage 34, Phi20 - Enterobacteria phage UAB\_Phi20, sal5 - Salmonella phage 103203\_sal5, sal4 - Salmonella phage 103203\_sal4, Phi75 - Enterobacteria phage Phi75, SPN9CC - Salmonella phage SPN9CC, SEN22 - Salmonella phage SEN22, ep34 - Salmonella phage epsilon34, g341c - Salmonella phage g341c, 12. Emek - Salmonella phage vB\_SemP\_Emek, ST160 - Salmonella phage ST160, ST104 - Enterobacteria phage ST104 DNA, SE1 - Salmonella phage SE1.

**Результаты и обсуждение.** Получено филогеномное дерево P22-родственных бактериофагов. На основе этого анализа показана близость всех геномов фагов P22-группы.

Можно прогнозировать выделение перспективных для иммуномодулирующей терапии фагов при исследовании экологии вириома желудочно-кишечного тракта птицы. Сравнительный анализ геномов фагов группы P22 позволяет предложить, что для терапевтических исследований наиболее перспективны фаги: Phi20, Phi75, Sp25, Sp34, sal4, sal5, ST104, ST160 и SE1. Сам фаг P22 нельзя применять на практике, так как P22 с высокой эффективностью трансдуцирует гены, включая гены патогенности бактерий. Поиск среди родственных ему фагов нетрансдуцирующих бактериофагов может принести результат, перспективный для терапии птицы. Данное исследование показало возможность успешного расчета эволюционных расстояний между данными средней длины геномами бактериофагов с помощью программы JSpecies v.1.2.1. Это существенно сокращает время расчетов и позволяет использовать для сравнительного анализа геномов мощные настольные компьютеры, а не суперкомпьютеры или кластеры серверов.

*Исследование поддержано РФФИ для Василенко О.В. грантом №17-04-01425а, для Назиповой Н.Н. грантом №19-07-00996а.*

### Литература

1. Зимин А.А., Кочетков Ф.В., Кононенко С.И., Осепчук Д.В., Скобликов Н.Э. (2016) Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве. Электронный научный журнал КубГАУ. 2016, № 123. - С. 421-432.
2. Ahn J, Biswas D (2014) Influence of bacteriophage P22 on the inflammatory mediator gene expression in chicken macrophage HD11 cells infected with *Salmonella Typhimurium*. FEMS Microbiol Lett. Mar; 352(1):11-7.
3. 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.
4. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic 1. trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
5. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

### **UPGMA - анализ последовательностей хвостовых шпиков фагов, родственных *Salmonella phage P22* (*Lederbergvirus [P22-like viruses], Podoviridae*)**

<sup>1,2</sup>Зимин А. А., <sup>2</sup>Назипова Н. Н.

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино; zimmin@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института Прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, г. Пушкино

**Введение.** В странах южной Азии бактериальные инфекции желудочно-кишечного тракта являются одной из основных причин заболеваемости и смертности у людей [1]. Эта ситуация во многом связана с множественной устойчивостью к антибиотикам. Альтернативой антибиотикотерапии могут быть как бактериофаги, так и их белки. Сравнительно недавно было показано применение белкового шпика хвоста бактериофага P22, как антибактериального средства [2]. Шпик хвоста бактериофага P22 взаимодействует с липополисахаридами *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. В качестве антибактериального

средства был использован укороченный вариант этого белка. Шипик фага P22 был введен перорально курам. Он приводил к агглютинации *S. typhimurium*. Этот белок оказался устойчив к ряду кишечных протеаз кур, но не ко всем. За счет веществ лекарственного препарата удалось расширить устойчивость к протеазам. При пероральном применении, препарат белка шипиков значительно снижал колонизацию кишечника сальмонеллами и их дальнейшее проникновение во внутренние органы. Новые варианты этого белка можно получить путем выделения новых бактериофагов, родственных P22. Такие белки могут обладать большей афинностью к липополисахаридам бактерий, большей устойчивостью к протеазам и, что особенно важно, лучшими, по отношению к белку - шипика P22, физико-химическими свойствами. Важна растворимость этого белка в смеси с сахарами и белками - компонентами препарата. Ранее мы провели филогенетическое исследование малой выборки белков – шипиков и охарактеризовали эволюционно-близкие варианты [3].

**Задача исследования.** В этой работе мы решили провести UPGMA - анализ последовательностей белков - шипиков, кодируемых опубликованными геномами бактериофагов, родственными P22, для оценки сходства этих белков независимо от их эволюционного родства и, соответственно, времени эволюции белковых последовательностей. UPGMA - анализ последовательностей позволяет рассортировать белки на наиболее сходные и выбрать новые перспективные агенты для антибактериальной терапии.

**Методы.** Было проведено сравнение белка - шипика бактериофага P22 с таксономической группой белков хвостатых бактериофагов из базы данных Genbank. Для дальнейшего анализа нами были отобраны из результатов работы программного средства PSI-BLAST с  $E < 2e - 15$ .

**Результаты и обсуждение.** Получено UPGMA - дерево белков-шипиков P22 - родственных бактериофагов. Дерево было построено с использованием метода UPGMA [3]. На рисунке 1 показано оптимальное дерево с суммой длины ветви = 10,13159495. Процент дублирующих деревьев, в которых ассоциированные таксоны были сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (всего было сделано 1000 повторов этого теста), показаны рядом с ветвями [4]. Статистические расстояния были рассчитаны с использованием метода JTT-матрицы [5] и выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт. В анализе использовали 38 аминокислотных последовательностей. UPGMA - анализ был проведен в MEGA6 [6]. Наиболее сходными с белком хвостового шипика фага P22 оказались белки фагов белки фагов сальмонелл: A1, 34, vB SemP Emek, ST64T, A18a, SETP14, SE1, SETP1, SPN9CC, 22, SETP15, VTP1 и фагов, обозначенных в БД, как фаги энтеробактерий: UAB Phi20 и ST104 (обозначены на дереве ромбами). Белки фагов сальмонелл и энтеробактерий epsilon34, Sf6, CUS-3, Sf101, HK620, c341 и SEN22 образуют близкую группу с рядом отличий (обозначены кружками). В качестве удаленных маркеров сравнения мы использовали белок шипика *Rubella virus genotype 1E* (черный квадрат) и короткие хвостовые фибриллы фага T4 (кольцо). Интересно, что эти белки распределились по двум основным ветвям UPGMA – дерева последовательностей, сходных с белком - шипиком P22.

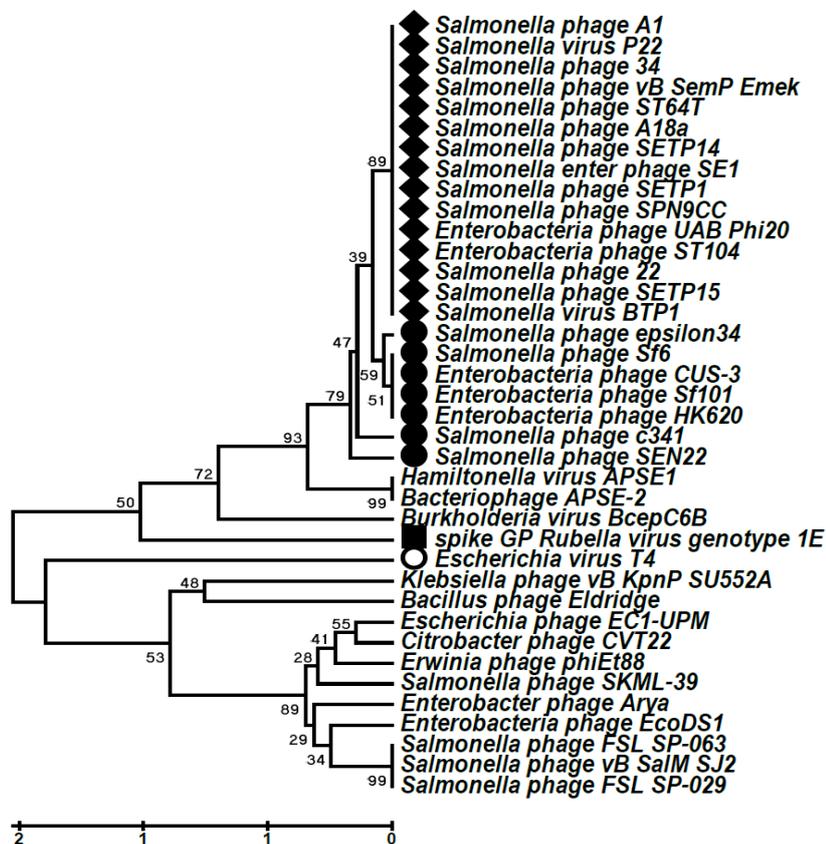


Рис.1. UPGMA-анализ белков - шпиков ряда фагов семейства *Podoviridae*.

*Исследование поддержано РФФИ для Назиповой Н.Н. грантом №19-07-00996а.*

#### Литература

1. World health statistics overview 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/DAD/2019.1). CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Waseh, S, et all. Orally administered P22 phage tailspike protein reduces salmonella colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. PLoS One. 2010 Nov 22;5(11):e13904.
3. Зимин А.А., Скобликов Н.Э., Кононенко С.И., Назипова Н.Н. Сравнительно-молекулярное изучение варибельности хвостовых шпиков фагов P22-типа для разработки препаратов для лечения молодняка сельскохозяйственной птицы. Сборник научных трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства. 2017. - Т. 2. - № 6. с. 28 - 31.
4. Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
5. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies... Evolution 39:783-791.
6. Jones D.T., et all. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences 8: 275-282.
7. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

## Филогеномика *Densovirinae*

<sup>1</sup>Зимин А. А., <sup>2</sup>Скобликов Н.Э.

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, zimin@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>ФГБНУ "Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии", г. Краснодар

**Введение.** *Densovirinae* имеют большое значение в сельском хозяйстве. Они заражают большое число видов насекомых – вредителей различных сельскохозяйственных культур. Денсовирусы двукрылых являются одним из основных средств борьбы с переносчиками вирусных инфекций человека и паразитических простейших. Население тропических стран в своей хозяйственной деятельности уже сейчас во многом зависит от применения средств на основе денсовирусов. Эта ситуация может привести к расширению круга хозяев этих вирусов и нанести вред как природе, так и сельскому хозяйству. Денсовирусы являются, например, паразитами креветок. По результатам данной работы филогенетическая близость вирусов креветок и ряда вирусов двукрылых может говорить о наличии перекрытия круга хозяев для этой группы штаммов *Densovirinae*. Филогеномика этих вирусов видится весьма актуальной, так как полученные знания могут объяснить происхождение того или иного штамма вируса у конкретного вида животных. Эти сведения могут быть использованы для разработки подходов для ПЦР-детекции результатов применения *Densovirinae* в агрономии. Одновременно, задача по анализу эволюции этой группы корпускулярных форм жизни с большими различиями в длине геномов может оказаться существенной при решении задач по исследованию путей происхождения и ранних этапов эволюции жизни. П.Шустер в одном из писем писал: «Семейства парво- и арбовирусов послужили мне и Мафреду (М.Эйгену - АЗ) прообразом «первичного вироида», хотя и пришлось отказаться от них, так как они содержали ДНК вместо РНК» [1]. Согласно теории литокодирования (Lithocoding) для происхождения нуклеиновых кислот не полностью существенно, какой именно углевод входил в их состав [2]. То есть не идет речь о типе сахара и уж тем более выборе между только двумя нуклеиновыми кислотами. В этом случае *Densovirinae* могут оказаться наиболее предпочтительным объектом для эволюционных исследований. Необходимо также учесть, что это вирусы, хозяевами которых являются *Insecta*. На земле обитает, по крайней мере, 10 в 7 степени представителей таксона *Insecta*. Более того, ряд денсовирусов имеют укороченные геномы и требуют вирусов-помощников, например, аденовирусов. Многие из таких корпускулярных форм не образуют вирусного потомства. По данным признакам денсовирусы соответствуют ряду позиций, предложенных в теории «первичного вироида». По нашему мнению *Densovirinae* могут быть оптимальной системой для палеонтологических исследований среди существующих в данный момент времени корпускулярных форм жизни на Земле.

**Задача исследования.** Исследование было предпринято, чтобы выявить близость ряда денсовирусов насекомых – вредителей сельского хозяйства и создан задел для биоинформатических палеонтологических исследований.

**Результаты.** Эволюционная история была выведена с использованием метода минимальной эволюции [3]. На рис.1. представлено оптимальное дерево с суммой длины ветвей 14,79909545. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального составного правдоподобия [3] и выражены в единицах количества базовых замен на сайт. Анализ включал 50 нуклеотидных последовательностей полных геномов *Densovirinae*. Построение дерева было проведено с помощью пакета программ MEGA6 [3]. Денсовирусы чешуекрылых распадаются на две, удаленные ветви.

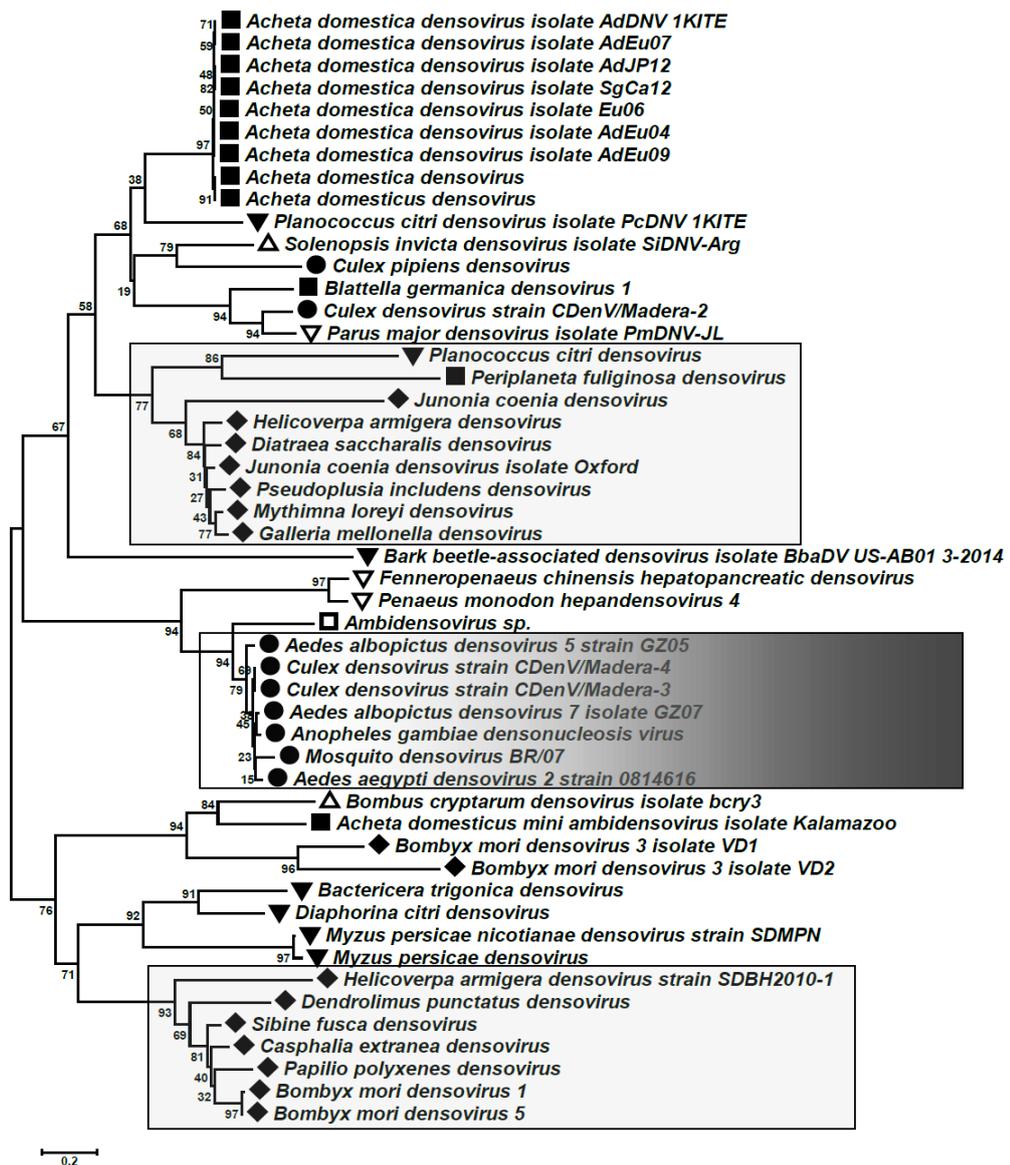


Рис.1. Филогеномное дерево *Densovirinae*. Кружком отмечены геномы денсовирусов видов отряда *Diptera*, ромбом – *Lepidoptera*, незаполненным треугольником вершиной вверх – *Hymenoptera*, треугольником вершиной вниз – *Hemiptera*, вирусы других животных – незаполненным треугольником вершиной вниз, незаполненным квадратом – амбиденсовирус. В рамки обведены две ветви с вирусами *Lepidoptera*; рамка, отмеченная серой волной, содержит ветвь геномов вирусов *Diptera* – переносчиков паразитарных простейших и вирусов человека.

**Благодарности.** Исследование поддержано для Зимина А.А. бюджетом ИБФМ РАН, для Скобликова Н.Э. РФФИ и администрацией Краснодарского края и выполнено им в рамках гранта №19-44-230040-р\_а.

#### Литература

1. Eigen, M., Schuster, P. The Hypercycle - A Principle of Natural Self-Organization. Spring-Verl., Berlin, 1979.
2. Skoblikov NE, Zimin AA. Hypothesis of Lithocoding: Origin of the Genetic Code as a "Double Jigsaw Puzzle" of Nucleobase-Containing Molecules and Amino Acids Assembled

by Sequential Filling of Apatite Mineral Cellules. J Mol Evol. 2016 May;82(4-5):163-72. doi: 10.1007/s00239-016-9736-x.

3. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

## Океанические гомологи белка DenV фага T4

<sup>1</sup>Зимин А. А., <sup>1,2</sup>Карманова А.Н.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушино; zimin@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>Вятский государственный университет, г. Киров

**Введение.** Продукт гена *denV* фага T4 - DenV - является бифункциональным белком, несущим функции ДНК-гликозилазы пиримидиновых димеров и апириимидиновой эндонуклеазы [1,2]. Это необходимо для выживания самых разнообразных живых существ в условиях большой инсоляции. Поиск гомологов этого белка может оказаться весьма интересным для характеристики океанических метагеномов пелагической микробиоты, подвергающейся высокому уровню воздействия УФ-излучения солнечного света [3].

**Методы.** Для сравнения а.к. последовательностей эндонуклеазы DenV бактериофага T4 с базами данных белковых последовательностей использовался алгоритм PSI-BLAST [4] с уровнем достоверности результатов  $E\text{-value} < 3e^{-29}$ . Полученный файл с а.к. последовательностями гомологов DenV T4 в формате FASTA объединили в один файл и использовали для обработки в пакете программ MEGA6 [5]. Выравнивание проводили программой MUSCLE [6]. Эволюционная история этих 65 белков была выведена с использованием метода UPGMA [7]. Данный метод используется для нахождения сходных последовательностей, без опоры на эволюционное время. На рисунке 1 показано оптимальное дерево с суммой длины ветви = 16,85573522. Процент дублирующих деревьев, в которых таксоны сгруппированы вместе в bootstrap тесте (888 повторов), показаны рядом с ветвями [8]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода JTT-матрицы [9] и выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт. Все позиции, содержащие пробелы и пропущенные данные, были делетированы.

**Результаты.** Полученное нами дерево гомологов белка DenV разделяется на две ветви, причем во второй находится лишь одна последовательность гомолога данной эндонуклеазы в составе морского метагенома - GOS\_91437, полученного из метагеномного анализа микробиоты проб поверхностных океанических вод вокруг побережий Северной Америки, также вод Саргассова моря, Галапогосских островов и Панамского канала, собранных Крейгом Вентером и его коллегами из Института Крейга Вентера (J. Craig Venter Institute, Rockville, Maryland, USA) в ходе экспедиций на яхте Колдун (Sorcerer II Global Ocean Sampling (GOS), проведенных в честь путешествия Чарльза Роберта Дарвина на корабле Бигль и экспедиции Джорджа Стронга Нэрса на корабле Челенджер в 19 веке [10 – 13].

Все остальные морские эндонуклеазы попали в первую ветвь, но их распределение произошло неравномерно: тенденции объединения в крупные общие клады наблюдаются не так часто, скорее оно идет попарно. В этой ветви интерес вызывают две ее крупные подветви.

В первой расположилась крупная клада последовательностей эндонуклеаз фагов и бактерий, возбудителей острых кишечных инфекций и представителей микрофлоры кишечника. Последовательность реперного белка, выбранного нами - DenV Escherichia virus T4 – оказался именно в этой подветви.

Большая часть всех найденных гомологов эндонуклеазы из морских метагеномов образовали вторую из двух крупных подветвей, объединившись с последовательностями морских бактерий. Это одни из основных представителей пикопланктона: *Prochlorococcus sp.* и *Candidatus Marinimicrobia bacterium*. Стоит заметить, что большая часть эндонуклеаз, отобранных нами из этих метагеномов, сходна именно с цианобактериями и объединена с ними в отдельную ветвь.

Интересно также, что во вторую подветвь, кроме последовательностей из морских обитателей, попали и эндонуклеазы микрофлоры носоглотки и ротовой полости, последовательности некоторых почвенных бактерий. Также сюда попали эндонуклеазы патогена *Brucella sp.*, вызывающего бруцеллез, и некоторые морские последовательности, в частности GOS\_7829903, GOS\_831869, GOS\_349615, GOS\_7731572.

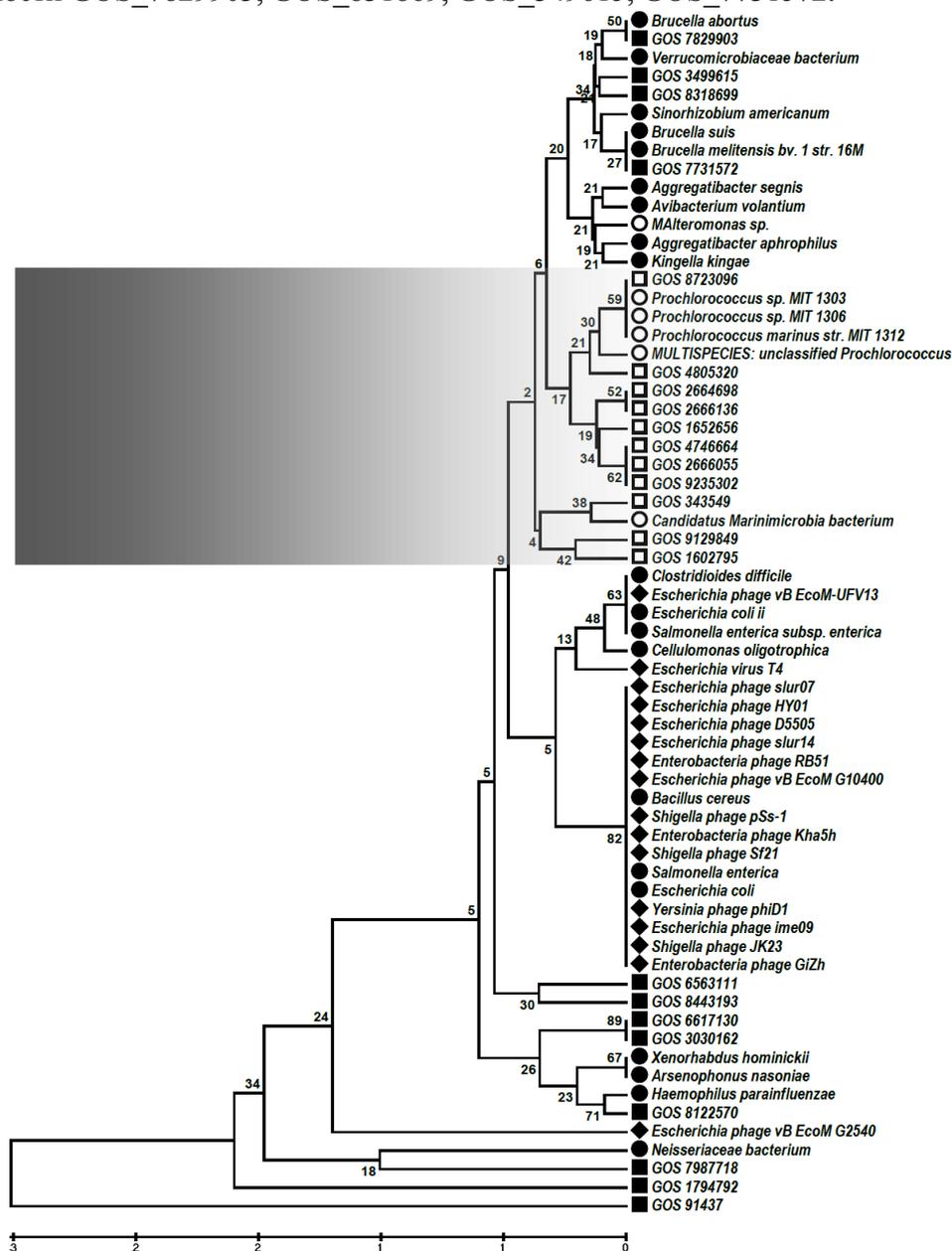


Рис.1. Сравнительный анализ океанических гомологов DenV - белка фага T4. Кругком отмечены последовательности из бактерий, кольцом – из морских бактерий, ромбом – из бактериофагов, квадратом последовательности из метагенома океана и незаполненным квадратом таковые, сходные с белками морских бактерий. В рамку обведены предполагаемые белки пелагического метагенома и морских бактерий, сходных между собой.

## Литература

1. Rubin JS. Int J Radiat Biol. 1988 Sep;54(3):309-65.
2. McMillan S, et al. J Virol. 1981 Oct;40(1):211-23.
3. Venter J.C., et al. Science. 2004. V. 304. № 5667. P. 66–74.
4. Altschul S.F., et al. Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
5. Tamura K., et al. Molecular Biology and Evolution. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
6. Edgar, R. C. (2004), Nucleic Acids Research 32(5), 1792-1797.
7. Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, S. Francisco.
8. Felsenstein J. Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
9. Jones D.T., et al. CABIOS 1992. V. 8. P. 275–282.
10. Williamson SJ, et al and Venter JC. PLoS One. 2012;7(10):e42047.
11. Williamson SJ, et al and Venter JC. PLoS One. 2008 Jan 23;3(1):e1456.
12. Rusch DB, et al and Venter JC. PLoS Biol. 2007 Mar;5(3):e77.
13. Yooseph S, et al and Venter JC. PLoS Biol. 2007 Mar;5(3):e16.

### **Новый конвергентный промотор As3 системы рестрикции-модификации II типа EcoRI играет ключевую роль в регуляции экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции**

*Казанцева О.А., Назорных М.О., Захарова М.В.*

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
Olesyakazantseva@bk.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_111-113

Исследования полных транскриптомов выявили, что в некоторых видах бактерий антисмысловые транскрипты встречаются у большинства аннотированных генов [Georg J., 2011]. Так, в случае *E. coli* были идентифицированы более 1000 антисмысловых транскриптов [Dornenburg J.E., 2010]. Даже учитывая то, что часть этих транскриптов может быть результатом транскрипционного шума, остальная значительная часть указывает на дополнительный пласт регуляции экспрессии генов [Нао N., 2017]. Существует два общих механизма обоюдного влияния двух направленных друг против друга (конвергентно) транскрипционных единиц: а) через антисмысловые РНК (асРНК), которые могут действовать как *in cis*, так и *in trans*; б) через транскрипционную интерференцию (ТИ) *in cis*. Однако часто эти два механизма могут дополнять друг друга и осуществлять более эффективную регуляцию генов.

Системы рестрикции-модификации (СРМ) широко распространены в царстве прокариот. Классические СРМ состоят из двух генов: гена метилтрансферазы (*met*) и гена эндонуклеазы рестрикции (*res*). Основной функцией СРМ является защита бактериальной клетки от проникновения чужеродной ДНК (например, ДНК бактериофага) и обеспечение, таким образом, стабильности генетического материала бактериального хозяина [Vasu K. 2013]. Для успешного установления СРМ в новой клетке бактериального хозяина необходимо, чтобы экспрессия гена *met* происходила раньше, а ген *res* экспрессировался с задержкой, позволяя ферменту ДНК-метилтрансферазе закончить модификацию ДНК хозяйской клетки, перед накоплением активного фермента эндонуклеазы рестрикции. Именно поэтому СРМ должны иметь очень тонкую и четкую регуляцию экспрессии генов. СРМ имеют огромное разнообразие по структурно-генетическому устройству. Регуляция в них осуществляется также разными способами, в основном на уровне транскрипции: во многих СРМ роль регулятора несет на себе сама метилтрансфераза

[Protsenko A. 2009, Zakharova M. 2004]; иногда СРМ содержат дополнительные рамки считывания, кодирующие особый регуляторный белок [Semenova E. 2005]. Однако остается группа СРМ (например, EcoRI, Eco29KI), регуляция которых предположительно осуществляется на транскрипционном и/или пост-транскрипционном уровне, где решающую роль могут играть антисмысловые регуляторные элементы.

Данное исследование посвящено изучению механизмов регуляции экспрессии гена *res* СРМ EcoRI. СРМ EcoRI – это линейная СРМ II типа, которая состоит из 2-ух последовательно и однонаправлено расположенных генов: гена *res* и гена *met*.

Ранее в СРМ EcoRI были обнаружены два перекрывающихся антисмысловых промотора (As1 и As2), расположенные внутри структурной части гена *res* на расстоянии приблизительно 400 нуклеотидов от стартового кодона гена *res* и предположительно связанные с негативной регуляцией этого гена на уровне транскрипции по неустановленному механизму [Liu Y., Kobayashi I. 2007]. С помощью биоинформатического анализа с использованием приложения BPROM (Prediction of bacterial promoters) SoftBerry был детектирован дополнительный антисмысловый промотор, названный As3, располагающийся внутри структурной части гена *res* в 174 нуклеотидах от стартового кодона гена *res*. Методом транскрипции *in vitro* было экспериментально показано наличие дополнительной +1 точки в антисмысловом направлении на расстоянии примерно 168 нуклеотидов от стартового кодона гена *res*, что подтверждает наличие биоинформатически предсказанного промотора, с которым могла связываться РНК-полимераза и осуществлять транскрипцию в условиях реакции *in vitro*. Для определения точной позиции стартовой точки транскрипции с промотора As3 использовали 5'-RACE метод. Анализ результатов 5'-RACE по определению 5'-концов РНК-транскриптов, синтезируемых с антисмыслового промотора As3 в условиях *in vivo* выявил наличие +1 на расстоянии 170 нуклеотидов от стартового кодона гена *res*, что подтверждает полученные ранее данные биоинформатического анализа и метода транскрипции *in vitro* для промотора As3. Дальнейшее клонирование антисенс-промоторного региона As3 в вектор, содержащий беспромоторный репортерный ген *galk* и выращивание штамма *E. coli* HB101, содержащего полученную конструкцию, на селективной среде МакКонки приводило к окрашиванию колоний, что указывает на эффективную транскрипцию с As3 промотора в условиях *in vivo*. Кроме того, для исследования транскрипционной активности антисенс-промотора As3 была создана конструкция As3:*galk* с мутацией в -10 области промотора inAs3:*galk* (TTATACT->ACTGCAG). Присутствие мутации приводило к потере окрашивания колоний на селективной среде МакКонки по сравнению с клетками *E. coli* HB101, содержащих конструкции As3:*galk* с нативным промотором, что согласуется с ранее полученными данными относительно наличия и локализации антисенс-промотора As3 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. При сравнительном анализе относительного уровня транскриптов конструкций As3:*galk* и inAs3:*galk* с помощью метода RT-qPCR выявлено, что введение мутации в -10 область As3 приводит к резкому снижению относительного уровня транскриптов примерно в 30 раз. Таким образом, был обнаружен и охарактеризован с помощью методов *in vitro* и *in vivo* новый антисмысловый промотор, As3 в системе EcoRI.

Следует также отметить, что в системе Eco29KI (структурная организация генов аналогична EcoRI), обнаруженные ранее два перекрывающихся антисмысловых промоторов локализованы также на расстоянии в 200 нуклеотидов от стартового кодона гена *res* [Nagornykh, 2011], что предположительно указывает на схожую регуляцию экспрессии генов *res* в СРМ Eco29KI и EcoRI.

Для подтверждения участия As3 в регуляции экспрессии гена *res* EcoRI была проведена серия клонирований фрагментов ДНК разной длины, содержащих рестриктазный промотор PR в плазмиду с репортерным геном *galk*. Сравнительный

анализ колоний штамма *E. coli* HB101, содержащего различные плазмидные конструкции, выявил, что присутствие As3 промотора, влияет на экспрессию репортерного гена *galk* и приводит к полной потере окрашивания колоний на селективной среде МакКонки. При сравнительном анализе относительного уровня транскриптов этих конструкций с помощью метода RT-qPCR выявлено, что присутствие As3 промотора приводит к резкому снижению относительного уровня транскриптов примерно в 6 раз. При чем, стоит отметить, что обнаруженные ранее антисмысловые промоторы As1 и As2 [Liu Y., Kobayashi I. 2007] не оказывают значимого эффекта на транскрипцию с промотора PR как As3.

В результате исследования был экспериментально установлен новый антисмысловый промотор As3 (расположенный в структурной части гена *res*, с +1 точкой на расстоянии 170 н.п. от стартового кодона гена *res*), присутствие As3 значительно снижает транскрипцию с рестриктазного промотора PR, что указывает на его ключевую роль в регуляции экспрессии гена *res* CPM EcoRI.

### Литература

1. Dornenburg J.E., Devita A.M., Palumbo M.J., Wade J.T. Widespread antisense transcription in *Escherichia coli*. // *MBio*. 2010 May 18;1(1).
2. Georg J., Hess W.R. Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Jun;75(2):286-300. doi: 10.1128/MMBR.00032-10.
3. Hao N., Palmer A.C., Dodd I.B., Shearwin K.E. Directing traffic on DNA-How transcription factors relieve or induce transcriptional interference // *Transcription*. 2017 Mar 15;8(2):120-125. doi: 10.1080/21541264.2017.1285851.
4. Hoffmann S.A., Hao N., Shearwin K.E., Arndt K.M. Characterizing Transcriptional Interference between Converging Genes in Bacteria // *ACS Synth Biol*. 2019 Mar 15;8(3):466-473.
5. Liu Y., Kobayashi I. Negative regulation of the EcoRI restriction enzyme gene is associated with intragenic reverse promoters // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189, № 19. — P. 6928–6935.
6. Protsenko A, Zakharova M, Nagornykh M, Solonin A, Severinov K. Transcription regulation of restriction-modification system Ecl18kI // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — V. 37. — P. 5322–5330.
7. Semenova E., Minakhin L., Bogdanova E., Nagornykh M., Vasilov A., Heyduk T., Solonin A., Zakharova M., Severinov K. Transcription regulation of the EcoRV restriction-modification system // *Nucleic Acids Res.* — 2005 — V. 33. —P. 6942–6951.
8. Shearwin K.E., Callen B.P., Egan J.B. Transcriptional interference--a crash course // *Trends Genet*. 2005 Jun;21(6):339-45.
9. Vasu K., Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense // *Microbiol Mol Biol Rev*. — 2013. — Vol. 77, № 1. — P. 53–72.
10. Zakharova M., Minakhin L., Solonin A., and Severinov K. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 335. — P. 103–111.

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

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

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.Пушино;  
lenokap80@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_115-117

Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушино

C<sub>1</sub>-соединения биогенного и абиогенного происхождения являются субстратами для специализированной группы - аэробных метилотрофных бактерий. Наземные и морские экосистемы являются источниками метанола, метиламина и других C<sub>1</sub>-соединений. Метанол образуется при деметилировании пектина клеточных стенок при активном росте клеток растений и является основным летучим органическим метаболитом растений, поскольку его эмиссия в атмосферу составляет 100 Тг/год, часть его растворяется в поверхностных слоях океана. Метилированные амины – восстановленные формы органического азота, которые образуются в природе как побочные продукты разложения белков, аминокислот, некоторых алкалоидов, азотсодержащих пестицидов, присутствуют в растительных и животных тканях как естественные продукты азотного обмена. В морской среде, метиламин высвобождается при деградации четвертичных аминов, таких как бетаин, карнитин, холин и N-оксид триметиламина, которые используются в качестве осмолитов многими морскими организмами. Представители рода *Rhodococcus* широко распространены в природе и обладают большой метаболической пластичностью, являются перспективными промышленными микроорганизмами для биотрансформации, биодеградации и биодетекции многих экологически важных органических соединений. Однако метилотрофные виды рода *Rhodococcus* до сих пор не описаны. Из прибрежной зоны Азовского моря нами выделен новый грамположительный факультативный метилотроф, характеристика которого является целью данной работы.

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

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

Окисление метанола у штамма *Rhodococcus* sp. 2AzMo осуществляется метанолдегидрогеназой, использующей 4-нитрозо-N,N-диметиланилин в качестве искусственного акцептора электронов, что согласуется с литературными данными для

представителей родов *Amiclatopsis* и *Mycobacterium*. Выявленные нами активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом выше по сравнению с НАД - зависимыми формами этих ферментов. У штамма *Rhodococcus* sp. 2AzMo отсутствуют активности специфических ферментов серинового (оксипируватредуктазы и серин-глиоксилат аминотрансферазы) и рибулозобисфосфатного (рибулозобисфосфаткарбоксилазы) путей. Исследуемый штамм реализует рибулозомонофосфатный (РМФ) путь  $C_1$  - метаболизма, о чём свидетельствует активность ключевого фермента этого пути – гексулозофосфатсинтазы. *Rhodococcus* sp. 2AzMo также имеет гексокиназу, активную с АТФ и ферменты окислительного пентозофосфатного пути (дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата). Обнаружена активность альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата (ФБФ), но не выявлена альдолаза 2- кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконата. Следовательно, данный штамм реализует ФБФ - вариант РМФ-пути.

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

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

## **Метилотрофные фитосимбионты способны синтезировать полилизин**

*Капаруллина Е. Н., Присяжная Н.В., Доронина Н. В.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
lenokap80@gmail.com

Многие аэробные метилотрофные бактерии (метилотрофы) тесно ассоциированы с различными растениями, реализуют различные стратегии положительного влияния на рост растений и являются фитосимбионтами. Результаты наших исследований показывают, что связь растений с метилотрофами является взаимовыгодной. Метилотрофы используют  $C_1$  – метаболиты растений и стимулируют рост и развитие растений за счет продукции биоактивных веществ: фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), витаминов (Доронина с соавт., 2015), солюбилизируя фосфаты (Агафонова с соавт., 2016), ферментов (Ekimova et al., 2018). Показано, что зимой при отрицательных температурах метилотрофы локализуются внутри растительных тканей, тогда как в весенний период активного метаболизма растений и выделения летучих  $C_1$ -соединений наблюдается интенсивное их развитие на листовой поверхности (Доронина с соавт., 2004).

На протяжении нескольких лет мы использовали протеомный МАЛДИ-анализ метилотрофных фитосимбионтов с пробоподготовкой, описанной ранее (Prisyazhnaya et al., 2012) в целях систематики. Проведенный анализ масс-спектров препаратов бактериальных клеток представителей родов *Methylobacterium* (*M. nodulans*, *M. marchantiae*, *M. extorquens*) и *Methylophila* (*Mp.musalis*, *Mp.turkensis*, *Mp.carotae*, *Mp.jiangsuensis*), выращенных на минеральной среде с 0.5% метанола, в весенний период показал, что штаммы содержали в своем профиле полимер с молекулярной массой мономерного звена 128 Да, соответствующей после гидратации аминокислоте L-лизину. Молекулярный вес соединений варьировал между 2000 и 4000 Да и такой полимер соответствует структуре полилизина (рис.1).

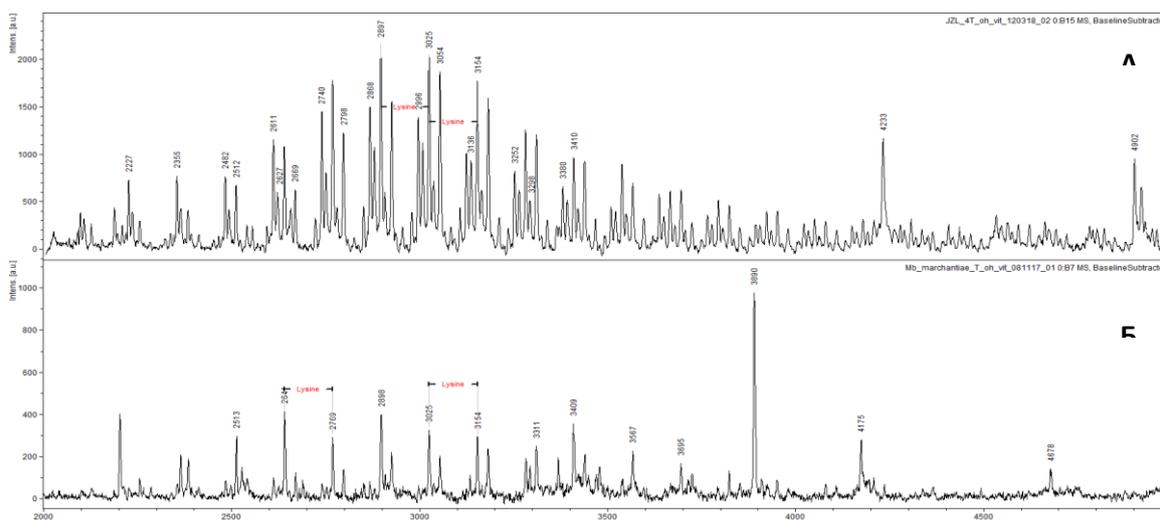


Рис. 1. Масс-спектры факультативных метилотрофных бактерий, представителей родов *Methylopila* (А) и *Methylobacterium* (Б)

Полилизин представляет собой гомополимер, состоящий из L-лизиновых мономеров, связанных между собой пептидной связью между ε-аминогруппой и α-карбоксильной группой (рис.2). Показано, что полилизин с длиной цепи, превышающей девять остатков L-лизина, проявляет антимикробную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая дрожжи, грибы, грамположительные и грамотрицательные бактерии (Yoshida and Nagasawa, 2003). Минимальная концентрация ингибирования полилизина в отношении ряда микроорганизмов была менее 100 мкг / мл, что указывает на то, что это соединение эффективно в отношении патогенов (Hiraki, 2000). Ввиду того, что полилизин является безопасным, биоразлагаемым и стабильным соединением в условиях высокой температуры и низкого рН, он введен в качестве пищевого консерванта во многих странах (Shukla et al., 2012).

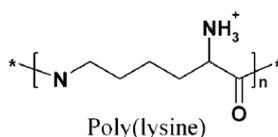


Рис. 2. Структурная формула полилизина

Появление этих полимеров в масс-спектрах метилотрофных фитосимбионтов отмечалось нами в марте-апреле в течение трех лет (2017-2019), однако они отсутствовали в профилях культур в летний, осенний и зимний период.

В весенний период происходит активизация метаболизма растений, формируется листва, активно образуются метаболиты - метанол, формиат, формальдегид. Можно предположить, что метилотрофы, синтезирующие полилизин, при колонизации растений имеют преимущества по сравнению с другими микроорганизмами – они используют C<sub>1</sub>-субстраты в качестве источников углерода и энергии и завоевывают пространство, подавляя рост другой микрофлоры. Затем, когда поверхность растения уже колонизована метилотрофами, они перестают синтезировать эти соединения.

Таким образом, впервые показано, что аэробные метилотрофные бактерии способны синтезировать полилизин, и рассмотрена гипотеза о возможной стратегии/роли полилизина у метилотрофных фитосимбионтов.

## Литература

1. Yoshida T., Nagasawa T. Epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V.62. P. 21–26.
2. Chang S.S., Lu W.Y.W., Park S.H., Kang D.H. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by  $\epsilon$ -polylysine. // *Int. J. Food Microbiol.* 2010. V.141. P. 236-241.
3. Zhou C., Li P., Qi X., . Sharif A.R.M, Poon Y.F., Cao Y., *et al.* A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-L-lysine // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 2704-2712.
4. Hiraki J.  $\epsilon$ -poly-L-lysine, its development and utilization // *Fine Chem.* 2000. V.29. P.18-25.
5. Shukla S. C. *et al.* Review on production and medical applications of  $\epsilon$ -polylysine // *Biochem. Eng. J.* 2012. V. 65. P. 70-81.
6. Hiraki J., Ichikawa T., Ninomiya S.I., Seki H., Uohama K. *et al.* Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -polylysine as a preservative in food // *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 2003. V.37. P. 328-340.
7. Ekimova G.A., Fedorov D.N., Tani A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Distribution of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase and D-cysteine desulfhydrase genes among type species of the genus *Methylobacterium* // *Antonie van Leeuwenhoek* 2018. P. 1-12. DOI: 10.1007/s10482-018-1061-5.
8. Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. Аэробные метиловобактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2015. Т. 51. № 2. С. 111-121.
9. Н. В. Агафонова, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, Ю.А. Троценко. Фосфатсолубилизирующая активность аэробных метиловобактерий // *Микробиол.* 2014. Т. 83. № 1. С. 28–32.
10. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Метанотрофы и метиловобактерии обнаружены в тканях древесных растений в зимний период // *Микробиол.* 2004. Т. 73. N 6. С.817–824.
11. Prisyazhnaya N.V., Plotnikova E.G., Bueva O.V., Korsakova E.S., Dorofeeva L.V., Il'ina E.N., Lebedev A.T., Evtushenko L.I. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of closely related species of the *Arthrobacter crystallopoietes* phylogenetic group // *Microbiology (Mikrobiologiya).* -2012. -V.81, -№.6. -P.696–701.

### **Инкапсулирование вирулентных бактериофагов в полиэлектролитные микроконтейнеры, с последующим разрушением оболочки микрокапсул**

<sup>1</sup>Ким А.Л., <sup>1</sup>Дубровский А.В., <sup>1</sup>Мусин Е.В., <sup>2</sup>Кудряшова Е.Б., <sup>2</sup>Арискина Е.В.,  
<sup>1</sup>Тихоненко С.А.

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
г. Пущино

<sup>2</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино; kimerzent@gmail.com

В последние годы в биомедицине приобретает развитие фаготерапия - метод лечения бактериальных заболеваний, путем введения бактериофага в организм больного. Бактериофаги – это вирусы, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода с последующим

лизисом (после внутриклеточной репликации) клетки- хозяина. По многочисленным данным вирулентные фаги могут быть использованы в качестве природных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями у людей, животных и сельскохозяйственных культур. Данный метод показал эффективную замену антибиотикам, но при этом обладают и рядом недостатков, а именно: снижение активности бактериофагов под действием желудочного сока и иммуноцитов кишечника, высвобождение большого количества эндотоксинов в результате одновременной гибели грамотрицательных бактерий. Инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы позволит решить эти проблемы: обеспечит доставку к месту назначения и пролонгированное высвобождение фагов. Целью работы является инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы, с последующим разрушением оболочки микрокапсул.

В рамках данной работы было проведено инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы, оболочка которых состояла из положительно и отрицательно заряженных полиэлектролитов - полиаргинина (ПАр), полиаллиламина (ПАА), полистиролсульфоната и декстрансульфата (ДС).

В данной работе была продемонстрирована возможность инкапсуляции бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы, а также показано, что инкапсулированные бактериофаги не оказывают воздействия на целевой бактериальный штамм. Была продемонстрирована возможность разрушения оболочки полиэлектролитных микрокапсул при помощи бактериальных спор, при инкубации данных капсул на питательной среде.

### **Лакказные изоформы гриба *Lentinus strigosus* 1566: потенциал для полимеризации фенилпропаноидов.**

***Коломыцева М.П., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Баскунов Б.П., Черных А.М.***

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),  
г. Пушкино; mkolomytseva@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_119-120

Три лакказные изоформы с отличающимися физико-химическими свойствами были выделены из культуральной жидкости базидиомицета *Lentinus strigosus* 1566, полученной в ходе погруженного культивирования в минеральной среде, содержащей 0.5 мМ CuSO<sub>4</sub>, 3 мМ 2,6-диметилфенол, поликапроамидное волокно и 30 г/л глюкозы (Kolomytseva et al., 2019).

Выделенные лакказы проявляли индивидуальную избирательность в реакции окисления фенольных соединений. Лакказы I, II и III (60, 66 и 63 кДа соответственно) проявляли максимальную активность в кислых условиях среды при температуре около 70 °С. Однако, лакказа III сохраняла свою активность (8-30 % в зависимости от используемого субстрата) и стабильность в ходе инкубирования в нейтральных условиях среды, что дает возможность использования фермента в биотехнологических процессах, протекающих при нейтральных pH.

Для некоторых лакказ гриба *L. strigosus* 1566 показан феномен их активации в процессе инкубирования при высоких температурах и различных значениях pH среды, а также осуществлено сравнение с подобными эффектами, описанными в литературе для других лакказ.

Согласно MALDI-ToF анализу лакказы I и II имеют наибольшее родство с лакказой гриба *Panus rudis* (AAR13230).

В ходе трансформации фенолпропаноидов (предшественников фармацевтически ценных лигнанов) доминирующими лакказами гриба *L. strigosus 1566* получены различные ранее неизвестные полимерные продукты, что придает выделенным лакказам гриба *L. strigosus 1566* большой потенциал для биотехнологического получения новых фармацевтически ценных аналогов лигнанов, стильбенов, флавоноидов и т.д..

Выделенные лакказы, продуцируемые одной и той же культурой, могут стать удобной моделью для будущих исследований структурных механизмов смещения Т-/рН-оптимумов оксидаз, процессов активации и механизмов Т-/рН-стабильности.

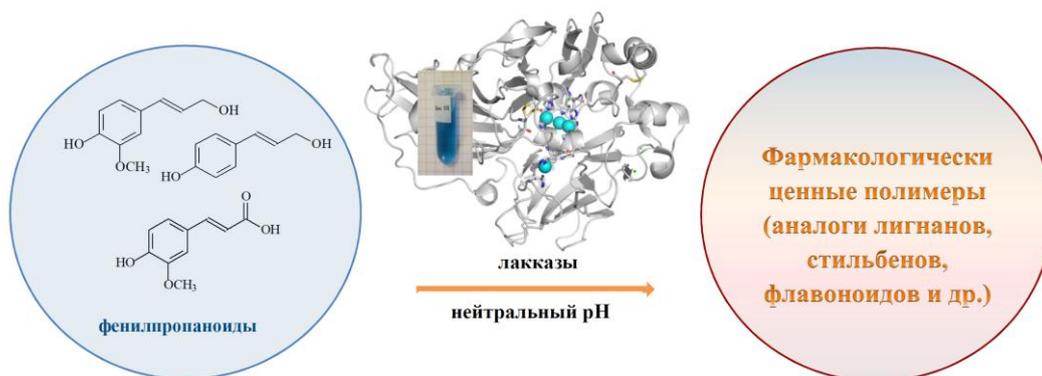


Рис. 1. Схематическое представление реакции полимеризации фенолпропаноидов лакказой гриба *L. strigosus 1566*

#### Литература

1. Kolomytseva M.P., Myasoedova N.M., A.M.Chernykh, Gaidina (Samoilova) A.S., Shebanova A.D., Baskunov B.P., Aschenbrenner J., Rosengarten F., Renfeld Zh.V., Gasanov N.B., Pinchuk I.P., Classen T., Pietruszka J., Golovleva L.A. Laccase isoform diversity in basidiomycete *Lentinus strigosus 1566*: Potential for phenylpropanoid polymerization. *Int J Biol Macromol*, 2019, V. 137, pp. 1199-1210, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.056

### Микрометод для идентификации оксидаз с различным рН-оптимумом

**Коломыцева М.П., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Черных А.М.**

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

Поиск новых биотехнологически ценных лакказ/оксидаз грибов с высоким редокс-потенциалом, активных в нейтрально-щелочной среде, активно привлекает исследователей последнее десятилетие во всем мире, однако сопряжен с проблемой редкой встречаемости подобных ферментов в природе.

Посредством модифицированного микрометода на основе хромогенной реакции с использованием индикаторных субстратов (сирингалдазина и 2,6-диметоксифенола, Рисунок 1) удалось провести успешную идентификацию лакказ/оксидаз грибов с различным рН-оптимумом в ходе погруженного культивирования 71 грибной культуры,

относящихся к различным таксономическим группам (Kolomytseva et al., 2017). Показано, что рН-оптимум окисления выбранных индикаторных субстратов грибными оксидазами совпадает с рН-оптимумом окисления ими других фенольных соединений, за исключением АБТК.



Рис. 1 Типичные хромогенные реакции субстратов-индикаторов, катализируемые грибными лакказами/оксидазами: А – АБТК (2,2-азино-бис (3-этилбензотиазолин 6-сульфоная кислота), зеленый продукт), Б - сиригальдазин (3,5-диметоксибензальдегид, розовый продукт) и В - 2,6-диметоксифенол (желтый продукт).

Благодаря высокой чувствительности (детектируемая лакказная активность в 4-6 раз меньше, чем пороговая лакказная активность, определяемая спектрофотометрически), большой производительности (измерение множества образцов в малых объемах – до 150 мкл), экономичности и скорости измерений, представленная модификация хромогенной реакции может быть применена для идентификации следовых количеств лакказной/оксидазной активности в биологических жидкостях в совокупности с их чувствительностью к рН-значениям среды, а также позволяет проводить мониторинг динамики продукции лакказ/оксидаз грибов в процессе их погруженного культивирования.

В результате проведенного скрининга было отобрано 9 грибных культур из различных таксономических групп, продуцирующие как типичные лакказы/оксидазы (активные в кислой среде), так и нетипичные (наиболее активные в нейтрально-щелочных условиях среды).

#### Литература

1. Kolomytseva M., Myasoedova N., Samoilova A., Chernykh A., Podieablonskaia E., Classen T., Pietruszka J., Golovleva L. Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimium. *Process Biochemistry*, 2017, Vol. 62, pp. 174-183, doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.027

#### Анализ генома нового изолята *Paenibacillus* sp.

<sup>1,2</sup>Кольжецов Н.П., <sup>1</sup>Глазунова О.А., <sup>1</sup>Озолин О.Н., <sup>1</sup>Шавкунов К.С.

<sup>1</sup>ИБК РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино,

<sup>2</sup>Факультет биотехнологии, Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, г. Москва, shavkunovks@gmail.com

В настоящее время широко распространено изучение микроорганизмов, обнаруживаемых в условиях вечной мерзлоты. Отдельное внимание в этом направлении уделяется исследованию бактерий и архей, ассоциированных с останками животных и человека.

Основой для представленного исследования послужил проведенный ранее анализ популяции бактерий, колонизировавших тонкий кишечник ископаемого *Bison priscus* (примерный возраст находки 50 000 лет). Всего было изолировано более 20 штаммов, которые были типированы по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и

отнесены к родам *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Okibacterium*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* и *Staphylococcus*.

Геномы пяти изолятов были секвенированы на платформе Torrent PGM; один из них принадлежит к роду грамположительных спорообразующих палочковидных бактерий *Paenibacillus*. Анализ последовательности гена 16S рРНК алгоритмом NCBI BLAST выявил наиболее близкие родственные виды: *P. xylanexedens*, *P. amylolyticus*, *P. tundrae* and *P. tylopili*. Геном изолята удалось собрать в 21 контиг (длина от 5 122 to 2 048 145 п.н.), общая длина которых составила 7 336 471 п.н.

С использованием онлайн-алгоритма RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) была проведена автоматическая аннотация генома, что позволило идентифицировать 6 413 генов. Полученные данные были использованы для проведения мультилокусного филогенетического анализа по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям.

Бактерии, относящиеся к некоторым видам рода *Paenibacillus*, подвижны, и их клетки имеют жгутики. Более того, рисунок колоний, формирующихся на твердом субстрате, вид- и даже штамм-специфичен и, кроме того, зависит от состава питательных компонентов среды. В геноме нового изолята был обнаружен кластер из 5 генов (*fliS*, *fliD*, *flaA*, *flaG* и *fliW*), продукты которых обеспечивают данную функцию (Рис. 1). Интересно отметить, что аминокислотные последовательности этих белков совпадают с ортологами из известных представителей *Paenibacillus* всего на 77,39-90,84%.

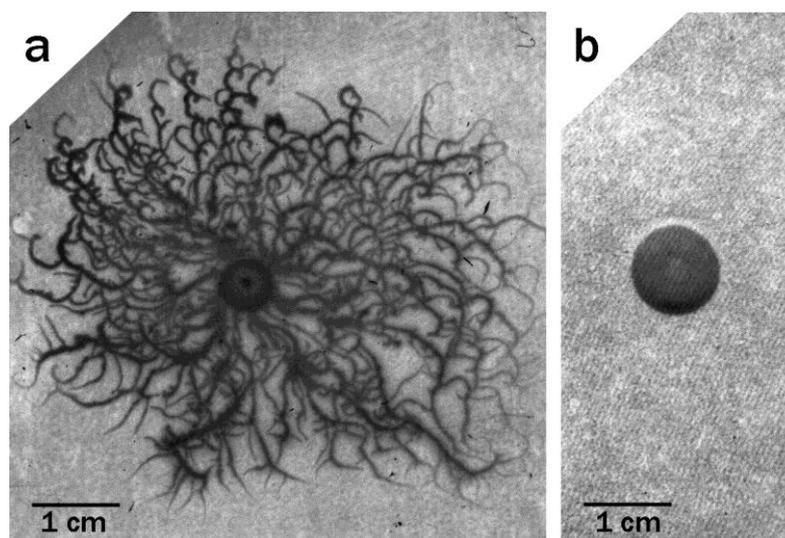


Рис. 1. Морфология колоний изолята ископаемого *Paenibacillus* после 3-дневного культивирования при температуре 30°C на: а) среде LB + 0,3% агара, б) LB + 1,5% агара.

В анализируемом геноме был также картирован ген, кодирующий лантионин-содержащий антибиотик, который существенно отличается по аминокислотной последовательности от продуктов, синтезируемых ранее известными бактериями *Paenibacillus*.

Наряду с другими признаками, эти результаты указывают на уникальные функционально значимые черты древнего изолята и обуславливают перспективность дальнейшего его подробного изучения.

*Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 18-14-00348).*

# Влияние мутации в гене бактериолитического фермента Л5 на биогенез внешнемембранных везикул *Lysobacter* sp. XL1

<sup>1</sup>Кудрякова И.В., <sup>1</sup>Афошин А.С., <sup>1</sup>Ивашина Т.В., <sup>1</sup>Сузина Н.Е.,  
<sup>2</sup>Серкова А.А., <sup>1</sup>Васильева Н.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»; kudryakovairina@yandex.ru,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_122-123

Бактериолитическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 является компонентом высокоэффективного антимикробного комплекса Лизоамидаза. Этот белок попадает в окружающую среду посредством внешнемембранных везикул, образуемых клетками *Lysobacter* sp. XL1 [1]. С использованием методов биохимии и электронной иммуноцитохимии были получены результаты, указывающие на то, что белок Л5 принимает участие в биогенезе определённой группы секреторных везикул, содержащих его в своем составе [2-4]. Целью данной работы было подтвердить роль белка Л5 в этом процессе. Для решения поставленной цели был проведен нокаут гена Л5 (*alpB*) и изучено влияние этой мутации на процесс формирования везикул.

Для введения мутации в геном *Lysobacter* sp. XL1 на основе суицидного вектора pJQ200SK сконструирована плазида, содержащая фрагмент ДНК с делеционным вариантом *alpB* (соответствует делеции 40 – 331 а.о в последовательности Л5-протеазы) и фланкирующими ген последовательностями геномной ДНК. Плазмиду вводили в клетки *Lysobacter* sp. XL1 методом электропорации с отбором меродиплоидных клонов. Об интеграции плазмиды в геном *Lysobacter* sp. XL1 свидетельствовала устойчивость трансформантов к гентамицину (маркер плазмиды) и тетрациклину (маркер кассеты, встроенный в участок делеции) и чувствительностью к сахарозе. В результате разрешения меродиплоидов отобраны  $\text{Suc}^{\text{R}}\text{Tc}^{\text{R}}\text{Gm}^{\text{S}}$  клоны, в которых произошел двойной обмен между мутантным и диким аллелями гена *alpB*. Наличие делеции в гене *alpB* подтверждено методом ПЦР с использованием специфических праймеров и секвенированием.

Анализ бактериолитической активности отобранных делеционных мутантов выявил, что по сравнению с диким типом литическая активность мутантного штамма была в 1,5 раза меньше. Из равных объемов культуры мутантного штамма *Lysobacter* sp. XL1 и дикого типа были выделены препараты везикул методом дифференциального центрифугирования. Методом электронной микроскопии, а также аналитическими методами установлено, что мутантный штамм образует меньшее количество везикул. Данный результат свидетельствует в пользу того, что бактериолитический белок Л5 действительно принимает участие в процессе формирования везикул *Lysobacter* sp. XL1. Полученные результаты позволяют предложить новый механизм биогенеза везикул у грамотрицательных бактерий.

В целом, успешный нокаут гена *alpB* *Lysobacter* sp. XL1 открывает многие перспективы как в изучении особенностей секреции бактериолитических ферментов и регуляции их генов, так и в создании гомологичной системы экспрессии литических белков, значимых для биомедицины.

## Литература

1. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles // *FEBS J.* – 2008. – V.275. – №15. – p.3827 – 3835.

2. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1 vesicles // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V.362. – №18. – fmv137.
3. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия.* – 2017. – Т.82. – №4. – с.677 – 686.
4. Kudryakova I.V., Gabdulkhakov A.G., Tishchenko S.V., Lysanskaya V. Ya., Suzina N.E., Tsfasman I.M., Afoshin A.S., Vasilyeva N.V. Structural and functional properties of antimicrobial protein L5 of *Lysobacter* sp. XL1// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018. – V.102. – №23. – p.10043 – 10053.

## **Модулирование нуклеазной активности Flap-эндонуклеаз на примере РНКазы Н бактериофага Т4**

*Кузницын Р.А., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
rafailkuzn@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_123-124

Flap-эндонуклеазы являются одними из ключевых ферментов, участвующих в таких процессах метаболизма ДНК, как репликация, рекомбинация и репарация. Семейство FEN1 структурно специфичных Flap-эндонуклеаз является наиболее охарактеризованным. Известно, что нуклеазы семейства FEN1 проявляют 5'-экзо- и flap-эндонуклеазную активности в отношении широкого диапазона РНК- и ДНК-субстратов. РНКазы Н бактериофага Т4 является типичным представителем нуклеаз семейства FEN1. Основная функция РНКазы Н заключается в удалении РНК-затравок при синтезе отстающей цепи репликативной вилки, но помимо этого фермент обладает также 5'-экзо- и flap-эндонуклеазной активностями на двунитевой ДНК. На сегодняшний день большинство белков бактериофага Т4, вовлеченных в процессы репликации и рекомбинации, выделены и охарактеризованы *in vitro*, поэтому фаг Т4 является удобным модельным объектом для изучения этих процессов.

Исследования условно летальных мутантов бактериофага Т4 показали, что выключение генов 46 и 47 (кодируют комплекс Mre11/Rad50) приводит к фенотипу "DNA arrest" (DA), который проявляется в остановке синтеза ДНК в позднее время инфекции и снижению выхода фага. Отобранные в результате спонтанного мутагенеза фаги, способные частично супрессировать DA-фенотип и давать жизнеспособное потомство, получили название das-мутанты (от англ. DNA arrest suppressor). Было установлено, что das-мутации приводят к заменам в РНКазе Н, которые находятся вне каталитического центра фермента. Более того, биохимический анализ выявил, что одиночные замены V43I или M42I приводят к значительному повышению экзонуклеазной активности РНКазы Н *in vitro*.

На основании анализа структуры РНКазы Н установлено, что замены M42 и V43 лежат на спирали Н2, причем функциональные группы этих аминокислотных остатков ориентированы в разные стороны - в направлении спиралей Н1 и Н4, соответственно. Спираль Н1 непосредственно участвует в расплетании двухцепочечной ДНК, а спираль Н4 взаимодействует с разветвленным участком ДНК-субстрата. Молекулярное моделирование позволяет предположить, что V43 взаимодействует с S107, находящимся на спирали Н4, а M42 – с F32, лежащим на спирали Н1, определяя относительное положение данных спиралей и характер их взаимодействия с субстратом. Для проверки

этого предположения был проведен мутагенез гена РНКазы Н и получены очищенные препараты следующих мутантных форм фермента: S107T, S107G и F32A, содержащие единичные замены, а также двойные замены V43I, S107T; V43I, S107G и M42I, F32A. Биохимический анализ показал, что замена в 107 положении действительно влияет на экзонуклеазную активность фермента *in vitro*: S107G снижает действие V43I, тогда как S107T усиливает эффект. Также было обнаружено, что замена F32A в большей степени влияет на эндонуклеазную активность РНКазы Н. Как оказалось, эндонуклеазная активность двойного мутанта M42I, F32A драматически падает, тогда как экзонуклеазная активность практически не меняется по сравнению с ферментом дикого типа. Таким образом, изменяя взаимодействие и относительное положение спиралей Н1, Н2 и Н4 в структуре РНКазы Н фага Т4 можно модулировать соотношение экзо- и эндонуклеазной активностей фермента.

## **Н-концевое ацетилирование рекомбинантных белков семейства «ЕF-руки» в условиях *in vivo***

*Лаптева Ю. С., Пермякова М.Е, Соколов А. С.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН;  
lapteva.julia@gmail.com

Большинство белков эукариот подвергается N-концевому ацетилированию, что может существенным образом изменять их структурные и функциональные свойства [1]. Рекомбинантные белки эукариот, нарабатываемые в бактериях, часто не содержат данную модификацию. В этой связи актуальна разработка метода N<sup>α</sup>-ацетилирования (N<sup>α</sup>-АЦ) рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии. N<sup>α</sup>-АЦ катализируют специфичные ферменты - N-концевые ацетилтрансферазы (АТ), различающиеся по субстратной специфичности, которая зависит от N-концевой аминокислотной последовательности ацетилируемого белка [2].

Ранее нами было установлено влияние N-концевой ацетильной группы на структурные и функциональные свойства некоторых белков семейства «ЕF-руки» [3, 4]. Парвальбумины и белки S100, относящиеся к белкам семейства «ЕF-руки» - это небольшие кальцийсвязывающие белки позвоночных, выполняющие в организме роль буферов/сенсоров катионов кальция/магния. Отдельные белки семейства S100 ассоциированы с заболеваниями человека и служат маркерами таких патологических состояний как рак и нейродегенеративные заболевания.

Для N<sup>α</sup>-АЦ целевых белков в условиях *in vivo* их гены были клонированы в плазмидный вектор pET-Duet в паре с геном одной из трех АТ *E.coli*. Конструкция вектора pET-Duet позволяет проводить наработку в клетках одновременно двух белков, так как содержит в своем составе два промотора фага Т7. Совместную экспрессию гена целевого белка и АТ проводили в штамме BL21(DE3) *E. coli*. Нами изучена активность трех АТ *E. coli* в отношении рекомбинантных парвальбуминов и белков S100 в условиях *in vivo*.

Нами показано, что АТ *E. coli* в условиях *in vivo* проявляют специфическую ферментативную активность по отношению к белкам семейства «ЕF-руки». Нами установлено, что уровень наработки целевых и степень их N<sup>α</sup>-АЦ зависит от условий культивирования и может достигать 50%. Примечательно, что АТ неактивные в отношении ряда белков в условиях *in vitro*, проявляют ферментативную активность в условиях *in vivo*. Наши результаты согласуются с имеющимися в мировой литературе

данными о том, что для  $\alpha$ -АЦ важное значение имеет как аминокислотная последовательность N-конца белка, так и его третичная структура. Таким образом, нами показано возможность применения бактериальных АТ для  $N^{\alpha}$ -АЦ рекомбинантных белков эукариот в условиях *in vivo*. Данный подход может быть распространен на другие эукариотические белки, нарабатываемые в бактериях.

*Данное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00701.*

#### Литература

1. Drazic, A., et al. The world of protein acetylation // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. – V. 1864: P 1372-1401.
2. Favrot, L., J.S. Blanchard, and O. Vergnolle, Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation // *Biochem.* - 2016. – V. 23. -P 989–1002.
3. Vologzhannikova, A.A., et al. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin  $\beta$ -1 from coho salmon // *Cell Calcium.* - 2017. – V. 67. - P 53-64.
4. Permyakov, S.E., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin // *Cell Calcium.* - 2012. – V. 52 (5). – P 366-376.

### **Структурно-функциональный анализ характеристик S1 доменов на примере исследования семейства рибосомных белков S1**

<sup>1</sup>Мачулин А.В., <sup>2</sup>Дерюшева Е.И., <sup>3</sup>Галзитская О.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),  
г. Пущино; and.machul@gmail.com

<sup>2</sup> ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,  
г. Пущино; evgenia.deryusheva@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_125-127

<sup>3</sup>Институт белка РАН, г. Пущино; ogalzit@vega.protres.ru

Семейство рибосомных белков S1 составляет около 20% от всех бактериальных белков, содержащих S1 домен [1]. Отличительной особенностью этого семейства является наличие множества структурных повторов S1 доменов у бактерий, количество которых изменяется в строго ограниченном диапазоне: от одного до шести [1]. Исследования 1453 последовательностей S1 белков (UniProt) показали, что число таких доменов можно рассматривать как отличительную особенность для филогенетической классификации бактерий по 25 различным отделам [2]. При этом, наиболее представлены белки, принадлежащие к отделу Proteobacteria и содержащие шесть S1 доменов (около 62% от всех записей). Этот факт, несомненно, связан с широким распространением этого отдела бактерий в природе и наличия доступных для него аминокислотных последовательностей в базе данных UniProt. Однако, не изменяющиеся число структурных доменов в этих бактериях, по-видимому, является эволюционной особенностью, которая необходима для их функционального разнообразия. Наименее представлены белки, содержащие два S1 домена (0,6%). Найденные последовательности в этой группе принадлежат бактериям из отделов Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria и, в основном, представлены отдельными представителями в каждом бактериальном классе в пределах одного отдела. Четырехдоменные S1 белки (33%) идентифицированы в основном в белках из отделов Firmicutes и Actinobacteria [2]. Полученные данные позволяют предположить, что

таксономическая принадлежность бактерий связана со структурными особенностями и многофункциональной активностью рибосомных белков S1.

Оценка уровня гомологичности различных бактериальных S1 доменов показала, что для длинных белков S1 (пяти- и шестидоменных доменных) центральная часть белков более консервативна, чем концевые домены, что, по-видимому, говорит о необходимости ее стабильности для функциональной активности. При этом, при выравнивании последовательностей между отдельными доменами в каждой группе выявляется довольно низкий процент идентичности, что указывает на то, что для общего функционирования этих белков структурный каркас (OB-fold) более важен, чем аминокислотная последовательность [2]. С другой стороны, бактериальные S1 белки в классическом смысле отличаются от белков с тандемными повторами. Так, мы обнаружили, что однодоменные и двухдоменные S1 белки имеют более стабильную и жесткую структуру, исходя из анализа процента их внутренней гибкости/разупорядоченности. Увеличение количества структурных доменов способствует возможному переходу части белков из свернутого состояния в состояние “расплавленной глобулы” (MG). Например, для белков, содержащих три и четыре домена, отношение прогнозируемого состояния MG составляет около 70%. При этом, относительно небольшой процент внутренней гибкости/разупорядоченности в отдельных структурных доменах можно рассматривать как показатель стабильности и жесткости отдельных S1 доменов. В то же время, соотношение гибкости в отдельных доменах, по-видимому, напрямую связано с их биологической активностью. Более стабильная и компактная центральная часть в мультидоменных белках важна для взаимодействия РНК, терминальные домены - для других функций. В то же время, равное соотношение областей, соединяющих вторичную структуру в отдельных доменах и между структурными доменами, указывает на примерно одинаковую организацию мультидоменных S1 белков, а также положение и соотношение вторичной структуры в отдельных доменах [3].

Изучение доступных трехмерных структур отдельных S1 доменов показало, что основной функцией бактериального S1 домена является связывание РНК через консервативные аминокислоты на поверхности домена. Для эукариот и архей домен S1 почти всегда взаимодействует с другими доменами, образуя центральный канал для перемещения РНК. Интересно, что домены, участвовавшие в образовании места прохождения РНК, гомологичны к S1 домену и, по-видимому, имеют эволюционное родство с ним. Исследование гибкости бактериальных, эукариотических и архейных S1 доменов из различных белков показало, что S1 домены имеют сходные структурные особенности. Наиболее гибкая область петли (область 40-50 а.е.) в S1 домене, по-видимому, может быть вовлечена во взаимодействие с природными лигандами. Таким образом, полученные результаты показывают, что число возможных функций для эукариотических белков, содержащих S1 домены, увеличивается за счёт увеличения количества структурных доменов и гибких перемычек между доменами, а не из-за изменения характеристик отдельных структурных доменов [4].

В целом, проведенное исследование позволило выявить особенности структурной организации отдельных S1 доменов, а также их специфические характеристики в мультидоменных комплексах, связанные с их функциональной активностью.

*Работа поддержана грантом РФФ № 18-14-00321.*

#### Литература

1. E.I. Deryusheva, A. V. Machulin, O.M. Selivanova, O. V. Galzitskaya, Taxonomic distribution, repeats, and functions of the S1 domain-containing proteins as members of the

- OB-fold family, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 85 (2017) 602–613.
2. A. V Machulin, E.I. Deryusheva, O.M. Selivanova, O. V Galzitskaya, The number of domains in the ribosomal protein S1 as a hallmark of the phylogenetic grouping of bacteria., *PLoS One.* 14 (2019) e0221370.
  3. A. Machulin, E. Deryusheva, M. Lobanov, O. Galzitskaya, Repeats in S1 proteins: flexibility and tendency for intrinsic disorder, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 2377.
  4. E.I. Deryusheva, A. V. Machulin, M.A. Matyunin, O. V. Galzitskaya, Investigation of the relationship between the S1 domain and its molecular functions derived from studies of the tertiary structure, *Molecules.* 24 (2019) 3681.

## Характеристика свойств фумараз А и С из облигатного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

<sup>1,2</sup>Мельников О.И., <sup>1</sup>Розова О.Н., <sup>1</sup>Хмеленина В.Н.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт;  
oleg96mel@gmail.com, rozovaolga1@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_127-128

Фумараза, являясь одним из ферментов цикла Кребса, обратимо катализирует гидратацию фумарата до малата. Фумараза в живом мире представлена двумя биохимически различными классами: А и С. Фумаразы класса А являются термолабильными, чувствительны к кислороду и имеют 4Fe-4S кластер в активном центре, тогда как фумаразы класса С термостабильны, не чувствительны к кислороду и не имеют железосерного кластера. Целью данной работы является изучение свойств рекомбинантных фумараз А и С из галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. Методами клонирования генов *fumA* и *fumC*, их гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) и последующей аффинной хроматографией на Ni-NTA агарозе были получены рекомбинантные ферменты, несущие на С-конце навеску из 6 гистидинов.

Фумараза С из *M. alcaliphilum* обратимо катализовала превращение фумарата в малат с максимальной активностью 45 Е/мг белка в направлении образования малата и 42 Е/мг белка в обратной реакции (дегидратации малата до фумарата). Фумараза С работала в широком диапазоне рН (от 6 до 9) с оптимумом рН 8,5 в реакции гидратации фумарата и рН 8,0 в обратном направлении. Температурный оптимум фермента составил 50°C. Экспозиция фермента при 40°C в течение 30 минут снижала активность на 80%. При оптимальном рН и 30 °С значение кажущейся  $K_m$  для фумарата составило  $0,11 \pm 0,04$  мМ. В направлении дегидратации малата фермент не подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен, коэффициент Хилла  $n$  составил  $2,07 \pm 0,35$ , а константа  $S_{0,5}$  для малата -  $0,14 \pm 0,01$  мМ. В присутствии одновалентных катионов  $K^+$ ,  $NH_4^+$  и  $Na^+$  активность фумаразы С увеличивалась почти в 2 раза. Ионы  $Cu^{2+}$  практически полностью ингибировали активность фермента, а  $Zn^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  снижали его активность на 78 и 50%, соответственно. Ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  не оказывали существенного влияния на гидратацию фумарата.

На активность фумаразы С существенно влияли различные интермедиаты метаболизма *M. alcaliphilum*. Изоцитрат, цитрат и ФЕП ингибировали активность фермента на 50%, 50% и 40%, соответственно. Пируват или глицин оказывали слабое активирующее действие (на 25% и 31%, соответственно).

Помимо фумаразы С, *M. alcaliphilum* имеет фумаразу А, проявляющую 10% идентичности транслированных аминокислотных последовательностей с фумаразой С.

Фумараза А метанотрофа на 70% идентична с ферментом из *Burkholderia xenovorans*, проявляющим большую специфичность к мезаконату, чем к фумарату.

Максимальная активность фумаразы А в реакции превращения фумарата в малат составила 155 Е/мг белка, а в реакции превращения малата в фумарат – 83 Е/мг белка. Фумараза А работает в диапазоне рН от 6,0 до 9,5 с оптимумом при рН 8,5 в обоих направлениях. Температурный оптимум фермента составил 30°C. Экспозиция фермента при 50°C в течение 60 минут приводила к снижению активности на 50%. Фумараза А не подчиняется кинетике Михаэлиса-Мэнтен, значение  $S_{0,5}$  для фумарата составило  $0,28 \pm 0,04$  мМ с коэффициентом Хилла  $n$   $1,4 \pm 0,2$ , а константа  $S_{0,5}$  для малата -  $0,55 \pm 0,03$  мМ (коэффициент Хилла  $n$   $1,7 \pm 0,1$ ). Интермедиаты метаболизма метанотрофа: ФЕП и глюкоза-6-фосфат (в концентрации 1 и 5 мМ, соответственно), слабо снижали активность фермента (на 20%), в то же время, глицин, пируват и сукцинат (в концентрации 1 мМ) оказывали незначительное активирующее действие на фермент (на 27%, 35% и 44%, соответственно).

Фумараза А, в отличие от фумаразы С, способна использовать в качестве субстрата 2-метилфумарат (мезаконат) с образованием 2-метилмалата ((S)-цитрамалат). Активность фермента в реакции мезаконат → (S)-цитрамалат составила 127 Е/мг белка, а  $S_{0,5}$  для малата  $0,24 \pm 0,02$  мМ с коэффициентом Хилла  $n$   $1,4 \pm 0,1$ . В отличие от *Burkholderia xenovorans*, *M. alcaliphilum* не имеет ферментов дальнейшего метаболизма (S)-цитрамалата, следовательно, реакция с мезаконатом является общим свойством фумараз А и не имеет физиологического значения для данного метанотрофа.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-00771).*

## **Оценка значения максимального выхода биомассы при росте клеток на нафталине как источнике вещества и энергии**

*Минкевич И.Г.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
г. Пушкино; minkevich@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_128-130

Теоретическая оценка максимального выхода биомассы из заданного субстрата, основанная на данных о его метаболизме в клетках, представляет интерес как с точки зрения физиологии и биоэнергетики роста микробной популяции, так и в аспекте биотехнологических приложений. В случае нафталина основной интерес представляет процесс его биодegradации, в ходе которого клетки штамма-деструктора используют это вещества как субстрат для роста.

Выход биомассы зависит от удельной скорости роста следующим образом [1,2]:

$$Y_{X/S} = Y_{X/S}^{\max} \mu / (m_s Y_{X/S}^{\max} + \mu),$$
 где  $Y_{X/S}$  — выход биомассы из субстрата, г/г,  $\mu$  — удельная скорость роста биомассы,  $Y_{X/S}^{\max}$  — максимальный выход биомассы,  $m_s$  — удельная скорость расхода субстрата на поддержание клеток. При скорости роста, значительно превышающей  $m_s$ , значение  $Y_{X/S}$  приближается к  $Y_{X/S}^{\max}$ .

Метод теоретической оценки значения  $Y_{X/S}^{\max}$  описан в работе [3]. Используются уравнения материально-энергетического баланса метаболизма и разработанный в ИБФМ пакет компьютерных программ GenMetPath (генератор метаболических путей) [3] В данной работе этот метод применен к клеткам, метаболизирующим нафталин. Варианты метаболических путей представлены в таблице в виде значений потоков через реакции

переднего обмена. Передним обменом названа совокупность биохимических реакций, преобразующих субстрат в набор узловых метаболитов — глюкоза, ацетил-КоА,  $\alpha$ -кетоглутарат, эритрозо-4-фосфат, оксалоацетат, рибозо-5-фосфат, 3-фосфоглицерат, фосфоенолпируват, пируват [3]. Последние преобразуются в вещество биомассы в ходе стандартного конструктивного обмена, обладающего практически постоянными стехиометрическими и биоэнергетическими характеристиками [3]. Потoki, представленные в таблице, даны в условных единицах. Эти значения соответствуют потокам в ммоль/ч, если объемная скорость роста биомассы равна 3,82 г/ч. Для других скоростей роста эти потоки могут быть пропорционально пересчитаны.

Реальное значение выхода,  $Y_{XS}$ , зависит от того, насколько велика скорость затрат субстрата на поддержание клеток,  $m_s$ , по сравнению с реально достижимой скоростью роста. При  $\mu = m_s Y_{XS}^{\max}$  имеет место следующее соотношение:  $Y_{XS} = 0.5 Y_{XS}^{\max}$

Максимальный выход биомассы из нафталина, г/г	0.755	0.776	0.80	0.83
Реакции и потоки через них ↓				
Salicylaldehyde dehydrogenase	39.55	38.45	37.35	35.9
cis-1,2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase	39.55	38.45	37.35	35.9
Catechol 2,3-dioxygenase	39.55	38.45	37.35	35.9
1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase	39.55	38.45	37.35	35.9
Naphthalene 1,2-dioxygenase	39.55	38.45	37.35	35.9
Salicylate 1-monooxygenase	39.55	38.45	37.35	35.9
2-hydroxymuconate-semialdehyde hydrolase	-39.55	-38.45	0	-35.9
trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase	-39.55	-38.45	-37.35	-35.9
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	39.55	38.45	37.35	35.9
2-oxopent-4-enoate hydratase	39.55	38.45	37.35	35.9
2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	-39.55	-38.45	-37.35	-35.9
2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	0	0	37.35	0
gamma-oxalocrotonate isomerase	0	0	37.35	0
gamma-oxalocrotonate decarboxylase	0	0	37.35	0
Formate dehydrogenase-N	39.55	38.45	0	35.9
NAD(P)+transhydrogenase (AB-specific)	-281.25	-196.2	-183	60
Glucose-6-phosphate isomerase	-172.63	-130.1	-123.5	-2
Fructose biphosphate aldolase	-61.48	-47.3	-45.1	-4.6
Triosephosphate isomerase	-61.48	-47.3	-45.1	-4.6
Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	-68.88	-54.7	-52.5	-12
Phosphoglycerate kinase	68.88	54.7	52.5	12
Phosphoglycerate mutase	-73.68	-59.5	-57.3	-16.8
Enolase	-73.68	-59.5	-57.3	-16.8
Pyruvate kinase	0	0	0	-28.5
Pyruvate decarboxylase	0	0	0	95.5
Pyruvate dehydrogenase complex	0	0	0	0
Pyruvate carboxylase	74.3	72.1	69.9	0
Citrate synthase	14.98	25.85	24.75	60.9
Aconitase (step 1)	14.98	25.85	24.75	60.9
Aconitase (step 2)	14.98	25.85	24.75	60.9
Isocitrate dehydrogenase (step 1)	3	25.85	24.75	3
Isocitrate dehydrogenase (step 2)	3	25.85	24.75	3
Oxoglutarate dehydrogenase	0	22.85	21.75	0

Succinate dehydrogenase	11.98	22.85	21.75	57.9
Fumarase (fumarate hydratase)	11.98	22.85	21.75	57.9
Malate dehydrogenase	23.95	22.85	21.75	115.8
Acetaldehyde dehydrogenase	39.55	38.45	37.35	131.4
Isocitrate lyase	11.98	0	0	57.9
Malate synthase	11.98	0	0	57.9
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	78.48	64.3	62.1	50.1
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	170.63	128.1	121.5	0
6-phosphogluconolactonase	170.63	128.1	121.5	0
Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	170.63	128.1	121.5	0
Ribose-5-phosphate isomerase	59.48	45.3	43.1	2.6
L-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	111.15	82.8	78.4	-2.6
Transketolase (KEGG R01641)	57.08	42.9	40.7	0.2
Transaldolase (KEGG R08575)	57.08	42.9	40.7	0.2
Transketolase (KEGG R01067)	54.08	39.9	37.7	-2.8
Glucose 6-phosphatase	2	2	2	2
Succinyl-CoA malate CoA-transferase	0	22.85	21.75	0
Malate-CoA ligase	0	-22.85	-21.75	0
Formate dehydrogenase-N	39.55	38.45	0	35.9
Fructose 1,6-bisphosphatase	61.48	47.3	45.1	4.6
ETC (complex I)	278.88	251.5	273.45	178.2
ETC (remaining part)	330.4	312.8	295.2	272

#### Литература

1. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., «Мир», 1978.
2. Минкевич, И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». 2005. Москва-Ижевск. 351 с. ISBN 5-93972-504-X
3. Minkevich I. G. Estimation of maximal values of biomass growth yield based on the mass-energy balance of cell metabolism. // Computer Research and Modeling. — 2019. — Vol. 11. — No. 4. — P. 723–750.  
[http://crm.ics.org.ru/uploads/crmissues/crm\\_2019\\_4/2019\\_04\\_11.pdf](http://crm.ics.org.ru/uploads/crmissues/crm_2019_4/2019_04_11.pdf)

### **Трансовариальная и трансфазовая передача боррелий из группы *Borrelia burgdorferi sensu lato* европейским лесным клещем, *Ixodes ricinus* L., 1758 (Acari: Ixodidae)**

<sup>2</sup>Митева О. А., <sup>1</sup>Григорьева Л. А., <sup>2</sup>Мясников В.А., <sup>2</sup>Гоголевский А.С.

<sup>1</sup>Зоологический институт РАН

<sup>2</sup>Государственный Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины  
МО РФ, DOI: 10.18334/ibpm2019\_130-132

Спирохеты комплекса *B. burgdorferi* s.l. являются возбудителями иксодового клещевого боррелиоза и передаются иксодовыми клещами из рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae). В Евразии широкое географическое распределение боррелиоза определяют два вида переносчиков: *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Уровни инфицирования популяции взрослых клещей *I. ricinus* возбудителями разными авторами оцениваются от 8 до 33 % (в редких

случаях до 60 %) (Vasilieva, Naumov, 1996; Vennestrom et al., 2008; Korenberg, et al, 2016). Зараженность клещей боррелиями характеризует эпизоотическое состояние природного очага трансмиссивной инфекции и его потенциальную эпидемиологическую опасность. Зараженность во многом определяется процессами горизонтальной передачи боррелий между резервуарными хозяевами и клещами и вертикальной передачи возбудителя по циклу развития клеща (трансовариальная и трансфазовая передачи). Принцип циркуляции боррелий в природных очагах инфекции был детально описан Балашовым (2009), однако возможность эффективной трансовариальной передачи и её значение по-прежнему активно обсуждается (Korenberg et al., 2016). Некоторые авторы отрицают саму возможность трансовариальной передачи (Nakao and Miyamoto, 1994), тогда как другие придают большое значение этому явлению (Балашов и Григорьева 1997). Целью данного исследования было определение особенностей распределения спирохет из группы *B. burgdorferi* s.l. в результате вертикальной передачи возбудителя на протяжении всего жизненного цикла *I. ricinus* в условиях естественных биотопов северо-запада России, и изучение влияния зимовки на выживание боррелий в спонтанно-зараженных клещах. Исследований, изучающих влияние сезонных природных изменений на сохранение и распространение в клещах возбудителей зоонозов, проведено чрезвычайно мало из-за трудоемкости работы (Herrmann et Gern, 2010). Сочетание экологических методов исследований клещей и молекулярной диагностики может представить реальную картину циркуляции и выживания *B. burgdorferi* s.l. в лесном клеще.

Материалом для исследования послужили 13 самок *I. ricinus*, их кладки, личинки, и нимфы, полученные из этих кладок. Взрослые клещи *I. ricinus* были собраны в тот же период из природных биотопов на севере Санкт-Петербурга (Курортный район, N 60 ° 12', E29 ° 42') и Ленинградской области (Выборгский район, N 60 ° 14 ', E29 ° 36 '). Самок клещей кормили на кроликах, личинок и нимф – на мышах. Выделение тотальной ДНК проводили из накормленных и отложивших кладки самок *I. ricinus*, их яиц, голодных личинок и нимф – до и после зимовки в естественных условиях в закладках. Для исследования, от каждой особи, из каждой кладки, личиночного и нимфального пула брали небольшое количество материала весом 10-15 мг. До проведения анализа образцы проб хранили в индивидуальных пропиленовых пробирках при температуре -68 °С и ниже. Перед подготовкой к выделению ДНК, клещей промывали в 70 % спирте, подсушивали, затем индивидуально гомогенизировали в 270 µl лизирующего буфера (25mM ЭДТА, 75mM NaCl, 10mM Tris [pH 7,5]) с последующим добавлением 30µl 10% SDS и 10µl раствора протеиназы К (20µg/µl). Выделение ДНК проводилось методом [x. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research – 1997, – Т. 25, – N. 22, – С. 4692-4693]. Определение в образцах ДНК *B. burgdorferi* s.l. проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием коммерческого набора «АмплиСенс» (ООО «Интерлабсервис», Россия), рекомендованного ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для выявления *B. burgdorferi* s.l. Амплификацию проводили на термоциклере QuantStudio 3 (Applied Biosystems, США). В ходе исследований, изучающих влияние сезонных изменений погоды на сохранение возбудителя и вертикальную передачу боррелий от фазы к фазе, клещи содержались в многолетних закладках в индивидуальных и групповых садках из мельничного газа в природных биотопах (Grigoryeva, Stanyukovich, 2016).

Положительная реакция на *B. burgdorferi* была отмечена у 6 самок *I. ricinus* (46,2 % от общего числа). Только четыре самки (66,7 % от числа инфицированных) из шести инфицированных (30,8 % от общего числа) лесного клеща передали боррелий в яйца и личинки и 50.0% от числа инфицированных (23.1% от общего числа) – нимфам. Последующее изучение материала, полученного из личинок лесного клеща, не

прошедших сезонную диапаузу, показало, что в процессе линек присутствие возбудителя сохранилось во всех четырех линий. В линиях, полученных от самок с порядковыми номерами 4, 6, 11 и 12, ДНК боррелий содержалась в материале полученном, как из кладок, так и из личиночных пуллов, в № 4, 6, 12 нимфальных пуллов. Результаты анализа проб, взятых из этих же пуллов личинок и нимф, прошедших сезонную диапаузу, были отрицательными.

Учитывая полученные данные, можно полагать, что в природных биотопах 2-е инфицированных самок европейского лесного клеща из 3-х могут передавать возбудителя своему потомству через яйца. Из 50% кладок от инфицированных самок выплываются инфицированные личинки. Однако, как показали наши эксперименты, в условиях зимовки у личинок и нимф происходит освобождение от возбудителя. Возможность к последующей трансмиссии возбудителей у клещей возникает только в случае их получения от перезимовавших прокормителей при питании на них в течение следующего после выноса сезона активности. Эти особи после метаморфоза в следующую фазу могут передать возбудителя прокормителям после завершения послеличного доразвития и активизации при последующем питании в сезон выноса до зимовки. Вероятно, в природных очагах ИКБ сохранение возбудителя обеспечивается постоянной циркуляцией между личинками и нимфами и их прокормителями.

#### Литература

1. Балашов Ю.С. (2009) Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб. «Наука» 357с.
2. Балашов Ю.С., Григорьева Л.А. (1998) Трансовариальная передача боррелий *Borrelia burgdorferi* s.l. таежным клещем *Ixodes persulcatus* (Ixodidae)// Доклады Академии Наук. Т. 363. № 3. С. 422-424.
3. Grigoryeva L.A. & Stanyukovich M.K. (2016) The features of the taiga tick life cycle *Ixodes persulcatus* Sch., (Acari: Ixodinae) in the North-West of Russia. *Experimental & Applied Acarology*, 69, 347-357. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0038-1>.
4. Herrmann C. & Gern L. (2010) Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *Journal of Medical Entomology*, 47, 1196-1204.
5. Korenberg E.I., Sirotkin M.B. & Kovalevskii Yu.V. (2016) A general scheme of circulation of ixodid tick-borne borreliosis pathogens in the natural foci of Eurasia. *Entomological Review*, 96, 484-499. <https://doi.org/10.1134/S0013873816040126>.
6. Nakao M., Miyamoto K., Fukunaga M. (1994) Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and ticks. *J. Infect. Dis.* 170, 4: 878-882.
7. Vennestrøm J., Egholm H. & Jensen P. M. (2008) Occurrence of multiple infections with different *Borrelia burgdorferi* genospecies in Danish *Ixodes ricinus* nymphs. *Parasitology International*, 57, 32-37. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0093>.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Грант № 18-04-00075.

#### **Клонирование и характеристика глюконаткиназ у нерастущих на сахарах метанотрофных бактерий**

<sup>1</sup>Мустахимов И.И., <sup>1</sup>Решетников А.С., <sup>2</sup>Бекен М.М., <sup>1</sup>Екимова Г.А

<sup>1</sup> ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; mii80@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_132-134

Аэробные метанотрофные бактерии – уникальная группа прокариот, использующих метан в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом они не способны расти на полиуглеродных субстратах, таких как глюкоза и могут служить модельными объектами для изучения ферментов ее метаболизма. Свободная глюкоза в клетках метанотрофов может образоваться только в результате деградации запасных питательных веществ - сахарозы или гликогена. Ранее было показано, что глюкоза фосфорилируется глюкокиназой в глюкозо-6-фосфат (через 6-фосфоглюконо-лактон) (Mustakhimov et. al., 2017). Помимо этого анализ геномов *in silico* выявил наличие у некоторых метанотрофов генов, предположительно кодирующих ферменты окисления глюкозы до 6-фосфоглюконата (глюкозодегидрогеназу, глюконолактоназу и глюконаткиназу), что указывает на функционирование у них второго, параллельного пути утилизации внутриклеточной глюкозы, ферменты которого не изучены.

Глюконаткиназа катализирует НАДФ-зависимую реакцию фосфорилирования глюконата до 6-фосфоглюконата с восстановлением никотинамидного кофактора. Целью данной работы является получение и биохимическая характеристика рекомбинантных глюконаткиназ у метанотрофов – галоалкалотолерантного *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z и нейтрофильного негалофильного *Methylobacter luteus*.

Открытые рамки считывания генов глюконаткиназы (*gntK*) *Mm. alcaliphilum* 20Z и *M. luteus* клонировали в экспрессионном векторе рЕТ-30. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* и последующей металл-хелатной аффинной хроматографии получили электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантных белков GntK. С помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле и гель-фильтрации было показано, что оба белка являются мономерами с молекулярной массой 20 кДа. Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом по образованию НАДФН в сопряженной реакции с 6-фосфоглюконатдегидрогеназой. Показано, что активность обоих ферментов полностью зависела от присутствия АТФ и ионов Mg. Глюконаткиназа из *Mm. alcaliphilum* 20Z проявляла наибольшую активность при 30 °С и рН 9,0, GntK из *M. luteus* был наиболее активен при 40 °С и значении рН 8,5. Фермент из *Mm. alcaliphilum* 20Z отличался высокой термостабильностью, резкое снижение активности наблюдали только при 70 °С. После инкубации в течении часа при 40 °С остаточная активность фермента из *M. luteus* составила 50% от контрольного значения, а после 5 минут при 50 °С снижалась в 10 раз. Увеличение концентрации NaCl в реакции до 0,2 М в случае фермента из *Mm. alcaliphilum* 20Z приводило к снижению активности в 2 раза по сравнению с контролем, при этом активность фермента из *M. luteus* оставалась неизменной. Увеличение концентрации NaCl до 2 М приводило к практически полной потере активности обоими ферментами. Ионы некоторых двухвалентных металлов, такие как Cu, Zn, Ni, Cd, Ba существенно ингибировали активность GntK из *Mm. alcaliphilum* 20Z (на 95-99,5%).

Активность глюконаткиназы из *Mm. alcaliphilum* 20Z на 80% ингибировалась в присутствии глюкозо-6-фосфата и на 95% при добавлении 6-фосфоглюконата, продукта реакции, а также фосфоенолпирувата. Активность GntK из *M. luteus* также ингибировалась 6-фосфоглюконатом и фосфоенолпируватом, но в меньшей степени - на 20% и 27% соответственно.

Таким образом, показано, что гены *gntK* *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Methylobacter luteus* действительно кодируют глюконаткиназы. Образованный в результате их активности 6-фосфоглюконат поступает далее в окислительный пентозофосфатный цикл с получением энергии, но потерей С-С связи, или распадается до С<sub>3</sub> метаболитов в пути Энтнера-Дудорова. Полученные данные свидетельствуют о метаболическом разнообразии путей

вовлечения внутриклеточной глюкозы в центральный метаболизм у нерастущих на сахарах метанотрофов и являются фундаментальной основой для дальнейших исследований.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00728-а*

#### Литература

1. Mustakhimov II, Rozova ON, Solntseva NP, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Trotsenko YA. The properties and potential metabolic role of glucokinase in halotolerant obligate methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 Mar;110(3):375-386.

### **Факторы, влияющие на гемолитическую активность гемолизина II *B. cereus***

<sup>1</sup>Нагель А.С., <sup>1</sup>Андреева-Ковалевская Ж.И., <sup>2</sup>Колесников А.С., <sup>1</sup>Сиунов А.В.,  
<sup>1</sup>Солонин А.С.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), г. Пушкино;  
solonin.a.s@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_134-135

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт», г. Пушкино

Цитолитические пороформирующие токсины играют главенствующую роль в развитии заболеваний. Один из цитолитических порообразующих токсинов *Bacillus cereus* – гемолизин II представляет особый интерес, так как он широко распространен среди бацилл цереусной группы. Ген гемолизина II обнаружен не только в *B. cereus*, который может вызывать диаррейный и эметический синдромы, а также заболевания глаз, маститы и другие болезни, но и в клетках *B. thuringiensis*, являющимся патогенным для насекомых и использующимся для производства инсектицидных препаратов, и в клетках *B. anthracis*, который вызывает сибирскую язву. Цитолитическое патогенное действие HlyII на разные клетки и макроорганизмы обусловлено образованием ионпроводящих каналов в клеточных мембранах. При заражении макроорганизма бактериями, продуцирующими гемолизин II, может происходить лизис множества эукариотических клеток, что приводит к нарушению функционирования атакуемых органов и гибели организма хозяина. Белковая последовательность HlyII (исключая 94 С-концевые аминокислоты) имеет 31% идентичности с последовательностью  $\alpha$ -гемолизина *S. aureus*. Нами были получены рекомбинантные штаммы *E. coli* - продуценты внутриклеточного гемолизина II *B. cereus* ATCC14579 с С-терминальной последовательностью (HlyII) и без неё (HlyII $\square$ С). HlyII и HlyII $\square$ С способны взаимодействовать с липидными мембранами. Эритроциты разных видов животных имеют разную чувствительность к гемолизину II - эритроциты кролика являются самыми чувствительными из эритроцитов проверенных к настоящему времени. Было показано различие в действии полноразмерного гемолизина II *B. cereus* ATCC14579 и его делеционного варианта. Ранее наблюдаемая разница в чувствительности мышинных и кроличьих эритроцитов к действию HlyII в десятки раз увеличивалась до сотен при атаке этих эритроцитов HlyII $\square$ С. Однако, при продолжительной обработке эритроцитов HlyII $\square$ С наблюдали ту же самую разницу в десятки раз, как и для HlyII. После 15 сек. обработки эритроцитов HlyII и HlyII $\square$ С с последующей их многократной отмывкой показано, что оба гемолизина полностью связались с эритроцитами. После обработки

кроличьих и мышинных эритроцитов гиалуронидазой их чувствительность к действию Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub> выравнивалась. Обработка кроличьих эритроцитов антагонистами рецепторов приводила к уменьшению гемолитической активности обоих вариантов гемолизина II. Из полученных данных можно предположить, что гемолизин II способен взаимодействовать не только с липидами мембран, но и с гликокаликсом и рецепторами эукариотических клеток, а С-терминальная последовательность гемолизина II стимулирует эти взаимодействия.

## **Влияние органических и неорганических источников углерода на процесс биоокисления сульфидного концентрата**

<sup>1,2</sup>Нечаева А.В., <sup>1,3</sup>Елкина Ю.А., <sup>1</sup>Меламуд В.С., <sup>1,3,\*</sup>Булаев А.Г.

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

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

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Биологический факультет, г. Москва; \*bulaev.inmi@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_135-137

Биогидрометаллургические технологии применяются для переработки сульфидных руд и концентратов по всему миру уже несколько десятилетий. Основной областью применения биогидрометаллургии является переработка упорных золотосодержащих концентратов. Эта технология основана на процессе деструкции сульфидных золотовмещающих минералов аэробными экстремально ацидофильными микроорганизмами, окисляющими двухвалентное железо и серу для получения энергии. Она позволяет перерабатывать сульфидные концентраты, не создавая высокой нагрузки на окружающую среду, значительно повышая степень извлечения золота цианированием из упорных сульфидных концентратов [1]. Несмотря на то, что основы этой биотехнологии были разработаны еще в 70-х годах 20 века, до сих пор проводятся исследования с целью изучения влияния различных факторов на эффективность процесса. Важным фактором может являться доступность органического и неорганического источника углерода в среде, так как среди микроорганизмов, окисляющих сульфидные минералы, встречаются как автотрофы и гетеротрофы, так и миксотрофы [2].

Целью данной работы являлось определение влияния дополнительного источника углерода (СО<sub>2</sub> и мелассы) на биоокисление золотосодержащего пирит-арсенопиритного флотоконцентрата при различных температурах.

Состав концентрата представлен в Таблице 1. Основными сульфидными минералами концентрата являлись пирит (56%) и арсенопирит (14%). Процесс биоокисления концентрата проводили в периодическом режиме в лабораторных реакторах объемом 2.5 л при следующих параметрах: аэрация – 5 л/мин, скорости вращения турбинной мешалки – 500 об/мин. Температура в первой серии экспериментов составила 39-40°С, а во втором – 49-50°С. Плотность пульпы (Т : Ж) составляла 1 : 5 (200 г концентрата на 1000 мл жидкой среды). Продолжительность эксперимента составила 40 сут.

В качестве инокулята использовали микробную культуру, сформировавшуюся в процессе биоокисления того же сульфидного концентрата при 40°С в проточном режиме, в которой преобладали ацидофильные бактерии *Leptospitillum ferriphilum*, *Sulfobacillus* spp., а также археи *Ferroplasma acidiphilum* и *Acidiplasma* sp.

Табл. 1 – Химический состав концентрата

Компонент	Содержание, %
Fe <sub>Σ</sub>	31,8
Fe <sub>S</sub>	29,1
S <sub>Σ</sub>	34,7
S <sub>S</sub>	34,4
S <sub>сульфатная</sub>	0,2
S <sup>0</sup>	0,1
As <sub>Σ</sub>	6,9
As <sub>S</sub>	6,5
Au, г/т	45,5

Инокулят вносили в реакторы в таком объеме, чтобы начальная численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе составляла  $1 \times 10^8$  кл/мл. В пульпу первого реактора осуществляли подачу CO<sub>2</sub> (примерно 0,01 л/мин). В пульпу второго вносили 0,02% мелассы (в начале эксперимента, на 10, 20 и 30 сутки). В контрольный реактор не вносили каких-либо дополнительных источников углерода. При проведении процессов биоокисления определяли параметры жидкой фазы пульпы биоокисления, которые позволяют оценить активность биоокисления (рН, Eh, концентрацию ионов Fe<sup>3+</sup> и Fe<sup>2+</sup>, а также мышьяка. При необходимости рН пульпы регулировали путем добавления серной кислоты или карбоната кальция. Численность клеток микроорганизмов определяли прямым подсчетом с помощью фазово-контрастного микроскопа Carl Zeiss Jena ( $\times 1600$ ). После окончания эксперимента твердые остатки биоокисления отделяли от жидкой фазы пульпы и подвергали их химическому анализу для определения степени окисления сульфидных минералов.

При 40°C оба источника углерода в значительной степени повлияли на биоокисление концентрата, что подтверждалось как параметрами жидкой фазы пульпы, так и анализом твердых остатков биоокисления (Таблицы 2 и 3). Значение рН жидкой фазы пульпы в реакторах 1 и 2 быстро снижалось, тогда как в контрольном реакторе рН снижался намного медленнее. Во всех реакторах потребовалось внесение CaCO<sub>3</sub> для поддержания рН. В первом реакторе расход CaCO<sub>3</sub> составил 314 кг/т концентрата, во втором – 292 кг/т, тогда как в контрольном реакторе – 71 кг/т.

При 50°C подача CO<sub>2</sub> повлияла на биоокисление в большей степени, чем добавление мелассы (Таблицы 2 и 3). Во всех реакторах, так же как и при 40°C, потребовалось внесение CaCO<sub>3</sub> для поддержания рН. В первом реакторе расход CaCO<sub>3</sub> составил 456 кг/т концентрата, во втором – 137 кг/т, тогда как в контрольном реакторе – 102 кг/т.

Табл. 2 – Параметры жидкой фазы пульпы в конце эксперимента (на 40 суток)

Температура	Источник углерода	pH	Eh	Fe <sup>3+</sup> , г/л	Fe <sup>2+</sup> , г/л	As, г/л	Численность микроорганизмов, × 10 <sup>7</sup> кл/мл
40°C	CO <sub>2</sub>	1,4	730	41,4	1,4	10,9	60
	Меласса	1,37	736	37,8	1,4	10,9	110
	Контроль	1,26	730	19,6	0,14	10,3	33
50°C	CO <sub>2</sub>	1,72	753	56	1,75	12	24
	Меласса	1,55	667	8,12	1,68	3	22
	Контроль	1,36	662	5,74	2,31	2,1	12

Табл. 3 – Окисление сульфидных минералов и сульфидной серы после 40 суток биоокисления

Температура	Источник углерода	Окисление, %		
		Ss	Пирит	Арсенопирит
40°C	CO <sub>2</sub>	81	77	98
	Меласса	78	73	98
	Контроль	37	27	93
50°C	CO <sub>2</sub>	94	93	99
	Меласса	42	20	93
	Контроль	45	20	92

При 40°C более эффективному биоокислению соответствовала более высокая численность микроорганизмов в жидкой фазе пульпы. Таким образом, очевидно, что внесение дополнительного источника углерода, необходимого для конструктивного метаболизма хемолитотрофов, позволило увеличить активность биоокисления концентрата, так как повысило численность микроорганизмов в популяции. Однако стоит отметить, что при 50°C численность микроорганизмов в популяции различалась в меньшей степени, чем при 40°C. Анализ состава микробных популяций с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рНК показал, что при 50°C подача CO<sub>2</sub> в пульпу реактора привела к увеличению в популяции доли бактерий р. *Sulfobacillus*. Таким образом, вероятно, что на скорость биоокисления сульфидных минералов влияли также изменение количественных соотношений между микроорганизмами в популяции, а не только изменение их общей численности.

#### Литература

1. Johnson D.B. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste material // Current Opinion in Biotechnology. 2014. V. 30. P. 24–31.

### **Отбор и идентификация бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae* с неканоническими основаниями ДНК из природных источников**

<sup>1</sup>Никулин Н.А., <sup>2</sup>Воложанцев Н.В., <sup>2</sup>Кисличкина А.А., <sup>1</sup>Шляпников М.Г., <sup>1</sup>Зимин А.А.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

<sup>2</sup>ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии;  
nikitakulin@gmail.com, DOI:10.18334/ibpm2019\_137-139

**Введение.** На данный момент известно как минимум 19 неканонических оснований, входящих в состав ДНК различных бактериофагов [1, 2, 3]. Наибольшее число обнаруженных вариантов найдено у вирусов подсемейства *Tevenvirinae*. У различных фагов этого подсемейства экспериментально подтверждено наличие следующих неканонических оснований: 5-гидроксиметилцитозина,  $\alpha$ -гликозил-5-гидроксиметилцитозина,  $\beta$ -гликозил-5-гидроксиметилцитозина, гентобиозил-5-гидроксиметилцитозин, арабинозилированный гидроксиметилцитозин. Кроме того, при помощи методов биоинформатики было предсказано наличие и других модификаций оснований у этой группы вирусов. Являясь достаточно изученным подсемейством, *Tevenvirinae* могут быть использованы в качестве модельных объектов для исследования влияния неканонических оснований на эволюцию и экологию фагов. В данной работе подобран способ скрининга бактериофагов из природных источников для отбора вирусов подсемейства *Tevenvirinae*, содержащих неканонические основания в составе ДНК и проведена молекулярно-генетическая и геномная идентификация отобранных фагов.

**Материалы и методы.** Для исследования использовались бактериофаги, выделенные в предыдущих работах из воды с очистных сооружений города Пушкино Московской области и фекалий зубров [4]. Для скрининга было взято 50 штаммов, полученных из проб воды, инфицирующих *E.coli* В, 15 штаммов, инфицирующих *E.coli* С600 и 12, заражающих *E.coli* В из фекалий зубров. Для определения принадлежности к роду *Tevenvirinae* использовалась ПЦР с вырожденными праймерами [5]. Для определения принадлежности к виду *Escherichia virus T4* использовались специфические праймеры, отжигающиеся на консервативных последовательностях генома T4 [6]. Для определения наличия антирестрикционных механизмов у фагов использовали спот-тест для исследования ограничения роста фагов на штаммах *E.coli* с системами рестрикции-модификации (RM) II типа. При отсутствии роста на штамме с RM системой считалось, что фаг не обладает антирестрикционными механизмами. Фаги, отобранные по генетическим маркерам и наличию антирестрикционных механизмов затем исследовали методом электрофореза в 1% агарозном геле частиц. Фаги, отличающиеся по электрофоретической подвижности, использовали для секвенирования. Полногеномное секвенирование осуществлено на платформе Illumina MiSeq с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v. 3, сборка ридов осуществлялась при помощи SPAdes v. 3.11, Newbler v. 3.0 и Unicycler v. 0.4.7. Аннотирование осуществлялось при помощи RAST Annotation Server, SEED Viewer, а также сравнением последовательностей геномов из базы данных RefSeq хорошо аннотированных фагов данного подсемейства.

**Результаты и обсуждение.** В ходе скрининга 77 штаммов рабочей коллекции, выделенных из природных источников, было найдено 57 фагов, у которых не ограничивался рост на штаммах с системами RM II типа, все они содержали в составе своего генома последовательность, свойственную *Tevenvirinae*, 48 – консервативную последовательность вида T4. Оставшиеся 9 фагов выращивали до высокого титра (более  $10^{10}$  БОЕ на мл), в результате 7 фагов удалось вырастить до нужного значения. Затем, после очистки изопикническим центрифугированием, определяли электрофоретическую подвижность частиц этих вирусов. Оказалось, что у изучаемых фагов имеется 2 разных подвижности, одну из которых имеют 5 фагов, другую – 2, что, вероятно, связано с различным зарядом белка Нос. Для электрофореза фаговых частиц были успешно использованы не только очищенные фаги, но и фаголизаты. Было показано, что данный метод возможно применять для скрининга. Для секвенирования было отобрано 4 фага, три из которых имели одинаковую электрофоретическую подвижность, а один – другую. Их названия: *Escherichia virus PuMWB11*, *PuMWB13*, *PuMWB30* и *PuMWB40*. После аннотирования геномов оказалось, что первые 3 штамма (с одинаковой

электрофоретической активностью) принадлежат к подсемейству *Tevenvirinae*, роду *Mosigvirus* и к одному виду, PuWB40 – подсемейству *Tevenvirinae*, роду *Tequatrovirus*. Таким образом, метод электрофореза фаговых частиц позволил разделить изучаемые фаги с точностью до вида. При анализе геномов у PuMWB11, PuMWB13, PuMWB30 найдены гены, чьи продукты осуществляют модификацию dCMP до <sup>hm</sup>dCMP и арабинозилируют остаток <sup>hm</sup>dСТР. У PuMWB40 найдены гены, чьи продукты осуществляют модификацию dCMP до <sup>hm</sup>dCMP и производят гентобиоцилирование остатка <sup>hm</sup>dСТР. Таким образом скрининг при помощи ПЦР с вырожденными и специфическими праймерами, спот-теста на ограничение роста на штаммах с системами RM II типа, электрофореза фаговых частиц позволил отобрать вирусы, которые интересны с точки зрения изучения неканонических оснований ДНК. В данном случае из 77 штаммов было отобрано по сути 2 различных бактериофага. Они принадлежали к двух разным родам подсемейства *Tevenvirinae* с различными неканоническими основаниями в составе ДНК.

**Заключение.** В ходе работы был подобран способ скрининга бактериофагов из природных источников на наличие среди них Т4-родственных фагов с неканоническими основаниями и установления различия между отобранными фагами на уровне вида для секвенирования и дальнейших исследований. После секвенирования, сборки и аннотации, результаты скрининга были подтверждены: 3 фага принадлежали к одному виду рода *Mosigvirus*, обладали арабинозилированным 5-гидроксиметилцитозином, 1 – принадлежал к роду *Tequatrovirus*, обладал гентобиоцилированным 5-гидроксиметилцитозином. В дальнейшем планируется выделить Т4-родственные фаги с другими неканоническими основаниями в составе ДНК при помощи данного способа скрининга и изучить экологическую роль большого разнообразия неканонических оснований в составе ДНК данного подсемейства.

#### Литература

1. Weigele P, Raleigh EA. Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses. *Chem Rev.* 2016 Oct 26;116(20):12655-12687.
2. Thomas JA, Orwenyo J, Wang LX, Black LW. The Odd "RB" Phage-Identification of Arabinosylation as a New Epigenetic Modification of DNA in T4-Like Phage RB69. *Viruses.* 2018 Jun 8;10(6). pii: E313.
3. Lee YJ, Dai N, Walsh SE, Müller S, Fraser ME, Kauffman KM, Guan C, Corrêa IR Jr, Weigele PR. Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic DNA of widespread bacterial viruses. *PNAS* 2018 Apr 3;115(14):E3116-E3125.
4. Никулин Н.А., Зимин А.А. Исследование фаговой флоры очистных сооружений города Пущино, Московской области, а также фекалий зубров и бизонов Приокско-Тerrasного государственного природного биосферного заповедника. Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2016, Тула: Изд-во ТулГУ, 2016. 202 с., стр. 168
5. Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch NM. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *PNAS* 2005 Aug 30;102(35):12471-6.
6. Никулин Н.А., Шляпников М.Г., Зимин А. А. Анализ колифагов зубров на наличие антирестрикторных систем. Сборник научных трудов КНЦЗВ. - Краснодар, 2019. Т. 8. - № 1. стр. 123 – 128. DOI: 10.34617/54hk-q635

## Устойчивость к ингибиторам ферментов путей биосинтеза путресцина у *Acremonium chrysogenum* ВКМ F4081D, высокоактивного продуцента антибиотика цефалоспорина С

<sup>1</sup>Нураева Г. К., <sup>2</sup>Хомутов М. А., <sup>1</sup>Авданина Д. А., <sup>1</sup>Жгун А. А.

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии, г. Москва

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, г. Москва;  
nuraevagulgina@mail.ru

Мицелиальный гриб *Acremonium chrysogenum* – единственный организм, используемый в промышленном масштабе для биосинтеза антибиотика цефалоспорина С, являющегося исходным сырьем для производства нескольких десятков антибиотиков цефалоспоринового ряда 1 – 5-го поколений. Объектами нашего исследования явились: 1) *A. chrysogenum* ATCC 11550, штамм дикого типа, и 2) полученный на его основе *A. chrysogenum* ВКМ F4081D, высокоактивный продуцент цефалоспорина С. ВКМ F4081D получили классическим методом для повышения продукции вторичных метаболитов в грибных штаммах (многоаундовый случайный мутагенез с последующей селекцией по целевому признаку). При этом уровень биосинтеза цефалоспорина С увеличился в 200-300 раз. Ранее мы показали, что добавление 5 мМ спермидина или 1,3-диаминопропана может повышать выход цефалоспорина С у ВКМ F4081D на 10-15% [1]. Это важный с биотехнологической точки зрения результат, поскольку для промышленных продуцентов вторичных метаболитов в мицелиальных грибах, полученных классическими методами за последние десятилетия, достигнут технологический предел улучшения. Он выражается в том, что новые раунды мутагенеза больше не приводят к повышению целевой продукции. Показанное стимулирующее воздействие экзогенных полиаминов на высокоактивный продуцент цефалоспорина С может носить универсальный характер, поскольку аналогичные результаты продемонстрированы для высокоактивных продуцентов пенициллина G и ловастатина в улучшенных штаммах *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, соответственно [2–4]. Для изучения возможной взаимосвязи между полиаминами и биосинтезом цефалоспорина С у *A. chrysogenum* в нашей работе исследовали один из важнейших этапов биосинтеза полиаминов, процесс образования путресцина из L-аргинина. В грибах, как и в большинстве живых организмов, существует жесткий контроль гомеостаза концентрации полиаминов. Ключевые ферменты метаболизма полиаминов могут регулироваться как на уровне транскрипции, так и трансляции и деградации белка. В этой связи важно понять, произошли ли какие-либо изменения в эндогенном синтезе полиаминов у высокоактивного продуцента.

У мицелиальных грибов биосинтез путресцина из L-аргинина может происходить в результате функционирования двух альтернативных путей: 1) через образование L-орнитина ферментом аргиназой, с последующим декарбоксилированием ферментом орнитиндекарбоксилазой, ODC, (основной путь) или 2) через образование агматина ферментом аргининдекарбоксилазой, ADC, (альтернативный путь) с последующим получением путресцина в результате работы агмантиназы. Для ключевых ферментов обоих путей биосинтеза путресцина, ODC и ADC, соответственно, провели ингибиторный анализ против штаммов *A. chrysogenum*, ATCC 11550 и F4081D. Для ингибирования ODC использовали соединения  $\alpha$ -дифторметилорнитин (DFMO) и 1-аминоокси-3-аминопропаном (АРА). Для ингибирования ADC использовали хорошо охарактеризованное соединение  $\alpha$ -дифторметиларгинин DFMA и новый перспективный ингибитор аминокси-агматин (ao-Agm). Методом разведения капель в агаре определили эффект воздействия всех ингибиторов как для ODC, так и для ADC на штаммы *A.*

*chrysogenum* дикого типа и его высокоактивный аналог в концентрациях от 0.1 мМ до 5 мМ. Для обоих штаммов ингибиторы против ODC работали значительно эффективнее, чем ингибиторы против ADC. Наряду с этим, для всех 4-х соединений выявили разностный эффект воздействия на изучаемые штаммы-продуценты цефалоспорины С. Оказалось, что *A. chrysogenum* F4081D обладает значительно более высокой устойчивостью как к DFMO и АРА, с одной стороны, так и к DFMA и ао-Agm, с другой. Специфичность воздействия ингибиторов на биосинтез полиаминов показали после восстановления фенотипа при одновременном добавлении тестируемого ингибитора и 1 мМ спермидина. Также продемонстрировали, что эффект ингибирования может частично сниматься при комплементации 1 мМ  $\alpha$ -метил-спермидином, но не 1,3-диаминопропаном. 1 мМ  $\alpha$ -метил-спермидином действует примерно в 2 раза менее эффективно, чем 1 мМ спермидин.

Полученные данные важны как для общего понимания пересечения путей метаболизма полиаминов и бета-лактамов у *A. chrysogenum*, так и молекулярных основ повышения продукции цефалоспорины С в штамме *A. chrysogenum* F4081D.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173.*

#### Литература

1. Жгун А.А., Калинин С.Г., Новак М.И., Домрачева А.Г., Петухов Д.В., Джавахия В.В., Эльдаров М.А. БЮЭ. Влияние полиаминов на биосинтез антибиотика цефалоспорины С в штаммах *Ascremonium chrysogenum*. Известия вузов Прикладная химия и биотехнология. 2015;14: 47–54.
2. Martín J, García-Estrada C, Kosalková K, Ullán R V, Albillos SM, Martín J-F. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the *laeA* regulator. *Fungal Genet Biol.* 2012;49: 1004–13. doi:10.1016/j.fgb.2012.10.001
3. Zhgun AA, Nuraeva GK, Dumina MV, Voinova TM, Dzhavakhiya VV, Eldarov MA. 1,3-Diaminopropane and spermidine upregulate lovastatin production and expression of lovastatin biosynthetic genes in *Aspergillus terreus* via *LaeA* regulation. *Appl Biochem Microbiol.* 2019;55: 244–255. doi:10.1134/S0003683819020170
4. Zhgun AA, Nuraeva GK, Eldarov M. The Role of *LaeA* and *LovE* Regulators in Lovastatin Biosynthesis with Exogenous Polyamines in *Aspergillus terreus*. *Appl Biochem Microbiol.* 2019;55: 626–635. doi:10.1134/S0003683819060176

### **Трегалолипидные биосурфактанты термотолерантного углеводородокисляющего штамма *Gordonia amicalis* 1D**

*Петриков К. В., Делеган Я. А.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;  
bioscience.kp@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_141-143

Углеводородокисляющие бактерии являются одной из наиболее распространенных групп природных микроорганизмов. Перспективными бактериями-нефтедеструкторами являются представители рода *Gordonia*. Штамм *G. amicalis* 1D был ранее охарактеризован нами как эффективный деструктор алканов, сохраняющий окислительную активность при температуре роста до 50°C и продуцирующий поверхностно-активные соединения (биоПАВ или биосурфактанты). Связи биоПАВ с деградацией углеводов уделяется

особое внимание исследователей, так как считается, что эти соединения играют важную роль в потреблении гидрофобных субстратов. Помимо этого, биоПАВ обладают рядом свойств, обеспечивающих высокий потенциал биотехнологического применения биоПАВ [1].

Целью данной работы была характеристика способности штамма 1D к образованию внеклеточных биоПАВ в разных условиях роста и частичное определение структурных особенностей этих соединений.

Для оценки количества образуемых биоПАВ измеряли поверхностное натяжения культуральной жидкости. Максимальная продукция была показана при росте штамма 1D на гексадекане, при 40°C несколько выше, чем при 27°C (табл. 1). На эйкозаноле поверхностная активность также была выше при более высокой температуре, причём различие было гораздо существеннее: 40 мН/м при 40°C и 52 мН/м при 27°C. Для додекана продемонстрирована обратная закономерность: при 40°C продукция биоПАВ оказалась заметно ниже, чем при 27°C. Минимальная поверхностная активность у штамма 1D наблюдалась при росте на октане для обеих температур роста. Можно предположить, что такая существенная разница в продукции биоПАВ объясняется наличием в штамме нескольких систем биодegradации алканов, каждая из которых отвечает за окисление разных субстратов при разных температурах. Соответственно, эти системы деградации могут быть связаны с биосинтезом биоПАВ и влиять на их продукцию в зависимости от условий культивирования. С другой стороны, при изменении температуры изменяются такие параметры, как растворимость субстрата в воде, его испаряемость, и даже агрегатное состояние, что также может влиять на метаболизм. Кроме того, в случае октана низкий уровень продукции биоПАВ может быть следствием характерного для коротких алканов токсического действия на микроорганизмы.

Табл. 1. Поверхностное натяжение культуральной жидкости при росте *Gordonia amicalis* 1D при росте в жидкой среде Эванса в различных условиях.

Субстрат	Температура, °C	
	27	40
Октан	54 ± 2	58 ± 2
Додекан	44 ± 2	57 ± 2
Гексадекан	39 ± 2	35 ± 2
Эйкозан	52 ± 2	40 ± 2

Следует отметить, что опубликованных работ о структурном анализе внеклеточных биоПАВ гордоний очень мало. Известно, что эти бактерии продуцируют экзополисахариды и гликолипиды [2,3]. Для характеристики гликолипидов, прежде всего, необходимо определить углеводную компоненту [1]. Для этого биоПАВ, продуцируемые штаммом 1D, были выделены экстракцией из бесклеточного супернатанта с последующей очисткой колоночной хроматографией на силикагеле. Выделенные биоПАВ представляют собой смесь гликолипидов (рис. 1А). Очищенный биоПАВ подвергали гидролизу, полученные в результате углеводы идентифицировали методом тонкослойной хроматографии в сравнении со стандартами по коэффициенту удерживания для трёх различных элюентов (рис. 1Б-Е). В результате впервые показано, что в состав

внеклеточных гликолипидов гординии входит остаток трегалозы. Следует отметить, что в статье Догана с соавт. [4] упоминается образование трегалолипидов штаммом *Gordonia amarae*, однако в этой работе нет ни анализа структуры, ни ссылок на опубликованные данные, которые могли бы подтвердить такую классификацию биоПАВ.

В геноме штамма 1D были обнаружены гены, отвечающие за типичные пути синтеза трегалозы: *otsA* и *otsB* (из глюкозы), и *treY* и *treZ* (из мальтоолигосахаридов).

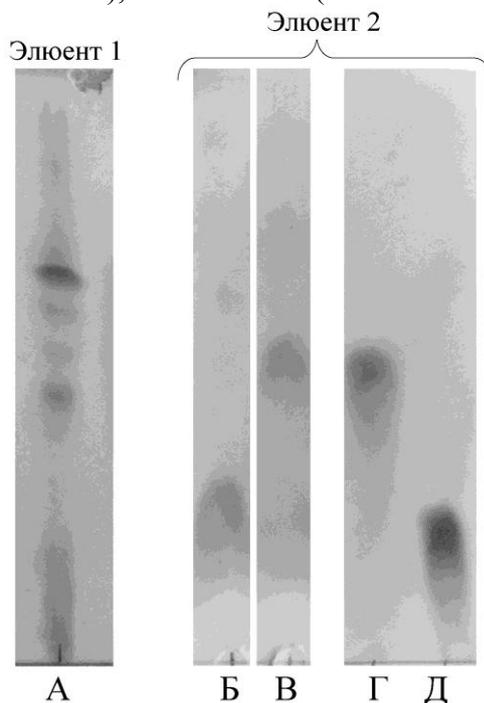


Рис. 1. Хроматограммы с проявлением  $\alpha$ -нафтолом (на углеводы)

(А) Очищенные биоПАВ *G. amicalis* 1D; (Б) БиоПАВ после щелочного гидролиза; (В) БиоПАВ после кислотного гидролиза; (Г) Стандарт глюкозы; (Д) Стандарт трегалозы.

Элюент 1: хлороформ-метанол-вода (65:15:2 об.). Элюент 2: хлороформ-метанол (3:2 об.).

Таким образом, было показано, что образование биоПАВ штаммом *G. amicalis* 1D значительно изменяется в зависимости от ростового субстрата и температуры культивирования. Впервые продемонстрировано, что представитель рода *Gordonia* продуцирует внеклеточные биоПАВ, относящиеся к классу трегалолипидов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00329.*

#### Литература

1. Marchant R, Banat IM. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett* 2012;34:1597–605.
2. Ta-Chen L, Chang J-S, Young C-C. Exopolysaccharides produced by *Gordonia alkanivorans* enhance bacterial degradation activity for diesel. *Biotechnol Lett* 2008;30:1201–6.
3. Franzetti A, Bestetti G, Caredda P, La Colla P et al. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol Ecol* 2008;63:238–48.
4. Dogan I, Pagilla KR, Webster DA, Stark BC. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:693–700.

## Регуляция генов деструкции нафталина происходит не только за счет участия специфического регулятора NahR

Позднякова-Филатова И.Ю., Петриков К.В., Ветрова А.А., Захарова М.В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;  
ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;  
irafilatova24@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_144

Механизмы регуляции активности генов деструкции салицилата в настоящий момент исследованы лишь с точки зрения влияния специфического регулятора NahR. В присутствии салицилата транскрипционный фактор активирует процесс транскрипции, позволяя РНК-полимеразе закрепиться на промоторе. В настоящей работе мы показали, что активность генов деструкции нафталина зависит не только от присутствия в среде салицилат-иона.

В штамме *Pseudomonas putida* BS3701 гены деструкции нафталина представляют собой несколько обособленных кластеров: гены, участвующие в конверсии нафталин-салицилат, салицилатгидроксилаза, три кластера генов, содержащих катехол 1,2 диоксигеназу и кластер генов, содержащий катехол 2,3 диоксигеназу. В связи с тем, что активность кластеров генов орто-пути регулируется регулятором CatR, активируемым в присутствии катехола, свои эксперименты мы ограничили наблюдением за поведением первых двух групп генов.

Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 выращивали на минеральной среде Evans, используя в качестве единственного источника углерода и энергии глюкозу или салицилат. Уровень мРНК нафталин 1,2 диоксигеназы (далее *NDO*) и салицилатгидроксилазы (далее *nahU*) действительно, в соответствии со схожими литературными данными, увеличивался в присутствии салицилата. При снижении концентрации нитрата аммония происходило значительное снижение количества мРНК и *NDO*, и *nahU*. Следует обратить внимание, что даже при снижении концентрации азота в среде, количество мРНК по-прежнему зависит от наличия салицилата. При снижении количества железа в среде культивирования путем добавления хелатора 2,2-дипиридила, наблюдается схожее изменение в количестве мРНК, как и в случае со снижением количества азота. В то же время, при культивировании штамма в микроаэрофильных условиях наблюдали значительное увеличение количества мРНК и *NDO*, и *nahU*. Добавление салицилата по-прежнему стимулировало увеличение количества мРНК. Вероятно, в регуляции активности генов деструкции нафталина и салицилата принимают участие глобальные транскрипционные факторы, которые пространственно не мешают взаимодействовать NahR с оператором и привлекать РНК-полимеразу.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05071

## Транскриптомный анализ как инструмент экотоксикологической оценки состояния гидробионтов

Прибыткова Е.В., Преминина О.С., Хмельницкая Д.В.

Северный Арктический Федеральный университет им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск;  
helengusakova@gmail.com, o.premnina@narfu.ru, d.hmeljnickaya@narfu.ru

Органические вещества сточных вод оказывают отрицательное воздействие на физико-химические показатели воды, ухудшая условия обитания гидробионтов. Токсические вещества сточных вод (фенолы, смолы, сульфиды и другие) оказывают на водные организмы прямое токсическое действие.

В этой связи актуальными становятся работы по изучению влияния сточных вод целлюлозно-бумажных комбинатов (ЦБК) на гидробионты.

Реакции водных организмов на действие токсических веществ антропогенного происхождения широко варьируют. Некоторые виды демонстрируют высокую устойчивость (как правило, это бентосные формы), другие виды чрезвычайно уязвимы (планктонные формы и рыбы) [1].

В основе метода биотестирования лежит экспериментальное определение концентраций токсичных веществ, которые вызывают легко определяемые и наиболее значимые нарушения у гидробионтов – выживаемость, смертность или патологические нарушения. В качестве тест-объектов используются организмы различных систематических групп: рыбы, беспозвоночные, водоросли и бактерии.

Целью нашей работы является адаптация методики дифференциальной экспрессии методом полимеразной цепной реакции в реальном времени при изучении влияния сточных вод на гидробионтах.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- постановка эксперимента с экспонированием тест-объектов в чистой и загрязненной воде;
- выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) и контроль качества выделенной РНК методами спектрофотометрии и гель-электрофореза;
- синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с участием олиго(dT) и гексануклеотидного праймеров;
- первичный анализ дифференциальной экспрессии методом ПЦР в реальном времени [2].

В данной работе проведена адаптация молекулярно-генетического подхода к оценке ответной реакции транскриптома гидробионтов на интегральный показатель токсичности сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП).

Проверка чистоты и измерение концентрации выделенной РНК производилась на спектрофотометре Implen NanoPhotometer (Германия). Для измерения вносилось по 2 мкл каждого образца. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Табл. 4 – Результаты исследования на спектрофотометре

Название образца	Концентрация	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
K1	22,880	1,964	0,560	0,272	2,014	0,289
K2	66,280	2,009	1,642	0,770	2,111	0,819
K3	128,96	3,191	3,244	1,523	2,145	1,017
K4	78,000	1,354	1,971	0,959	2,079	1,463
O1	48,320	1,317	1,204	0,559	2,146	0,914
O2	6,9600	0,492	0,202	0,141	1,540	0,375
O3	310,20	5,796	7,774	3,552	2,195	1,342
O4	267,88	7,156	6,716	3,089	2,181	0,938

Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) используют для оценки чистоты препарата. ДНК и РНК поглощают при 260 нм. Белки поглощают при 280 нм. Отношение 260/280 является оценкой чистоты образца. Для РНК 260/280 должно быть около 2 у.е. Значение ниже 2 у.е. может быть индикацией загрязнения или присутствия белков, фенола или других загрязнителей в образце.

Отношение 260/230 является вторым показателем чистоты образца, так как загрязняющие вещества поглощают 230 нм (например, ЭДТА). Коэффициент 260/230 должен быть выше, чем отношение 260/280, так обычно оно составляет от 2 до 2,2 у.е. Более низкое соотношение может быть показателем загрязнения.

По данным таблицы видно, что полученные соотношения 260/230 во всех образцах ниже 2 у.е. Это может быть обусловлено контаминацией белка или солями гуанидиния. Стоит отметить, что это соотношение не критическое для ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени позволяет детектировать даже небольшое количество ампликона в смеси.

Интересно отметить реакцию с праймером *sod* (супероксиддисмутаза). В контрольном образце К2 произошла амплификация и сигнал флюоресценции присутствует, в то время как в образцах выращенных на сточной воде интенсивность флюоресценции нулевая, следовательно амплификация не прошла. Данный ген в опытных образцах был подавлен, таким образом можно предположить, что сниженный уровень экспрессии *sod* является маркером на внешнее воздействие на организм.

Реакция с праймером *sod* (супероксиддисмутаза) в контрольном образце К2 произошла амплификация и сигнал флюоресценции присутствует, в то время как в образцах выращенных на сточной воде интенсивность флюоресценции нулевая, следовательно амплификация не прошла. Данный ген в опытных образцах был подавлен, таким образом можно предположить, что сниженный уровень экспрессии *sod* является маркером на внешнее воздействие на организм.

В случае ПЦР с *cat* (каталаза), интенсивность флюоресценции стремится к нулю во всех пробах.

С праймером *bche* (бутирилхолинэстераза) обратная ситуация, сигнал присутствует во всех пробах. Наиболее высокая интенсивность флюоресценции видна в пробах полученных с опытного образца О4. Отсюда следует вывод, что ген кодирующий бутирилхолинэстеразу сильнее проявляет себя в условиях антропогенной нагрузки. Полученные данные отличаются от описанных ранее исследований в работе Чуйко (2007), где приводится пример достоверной корреляции между накоплением токсикантов в тканях и ингибированием холинэстеразной активности [3].

Реакция с праймером *grx* (глутатионпероксидаза) прошла практически во всех пробах, за исключением *dNK2*. Наибольшая интенсивность отмечается у проб, полученных из опытных образцов с олиго(dT)18 паймером. С праймером *GST* (глутатионтрансфераза) сигнал амплификации также достаточно высок в пробах взятых у опытных образцов. Данные праймеры отвечают за амплификацию генов, формирующих ферменты глутатиновой системы, которая отвечает за преобразование перекисей в организме. Следовательно можно предположить, что в сточной воде происходит активация выработки данных ферментов, которые активно расходуются на нейтрализацию содержащихся в ней перекисей.

Реакции с праймерами *ache* (ацетилхолинэстераза) и *sur1a* (цитохром) прошли не во всех пробах, но явной зависимости не наблюдается.

Отсутствует сигнал амплификации для пробы *dNO4* с праймером референтного гена актина (*act*).

## Литература

- 1 Ким И.Н. О необходимости разработки базового профиля "пищевая биотехнология гидробионтов" / И.Н. Ким, В.В. Кращенко, Т.Н. Пивненко // Пищевая промышленность. – 2012. - №4. - с. 27-29

- 2 Орадова А.Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике // Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2013. – № 4. – с. 306-309.
- 3 Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология. Теоретические и прикладные аспекты. - М: Наука, 2009. - 400 с.

## Новые оксидазы аскомицетов

*Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Шебанова А.Д., Коломыцева М.П.*

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; mkolomytseva@rambler.ru; zhanna.renfeld@yandex.ru

Голубые медьсодержащие оксидазы (МСО) – представляют собой семейство ферментов, включающее лакказу, билирубиноксидазу и аскорбатоксидазу, а также церулоплазмин, с купредоксинподобной структурой, содержащие 4 атома меди в молекуле белка и осуществляющие восстановление молекулярного кислорода до воды с сопутствующим окислением молекулы субстрата (Sakurai, 2007).

Лакказы (бензендиол: кислород оксидоредуктазы, ЕС 1.10.3.2, “голубые” оксидазы) и лакказоподобные оксидазы - обычно внеклеточные мономерные гликопротеины, широко распространенные в природе ферменты, обнаруженные в бактериях, грибах, лишайниках, высших растениях и насекомых. Демонстрируют удивительно широкую субстратную селективность и способны окислять многочисленные соединения, как правило, ароматические по своей природе (Мясоедова, 2015).

Особый интерес на сегодняшний день представляют собой малоизученные лакказы аскомицетов, обладающих высокой скоростью роста и лакказной активностью на более ранних сроках культивирования, в особенности, в нейтрально-щелочных условиях среды, что несвойственно типичным лакказам базидиальных грибов (Hao et al., 2007; Elshafei et al., 2012). Алкалофильные лакказы имеют огромный потенциал применения в биотехнологических процессах, протекающих в нейтрально щелочных условиях среды: в качестве биокатализаторов в клеточном синтезе биоактивных соединений, в нанобиотехнологиях, для создания биотопливных ячеек имплантируемых приборов, биосенсоров, а также для обесцвечивания красителей и деградации токсичных соединений в промышленных сточных водах (Mate et al., 2016).

В настоящей работе основными объектами исследования были два аскомицета родов *Myrothecium* и *Curvularia*, оксидазы которых наиболее активны в нейтрально щелочных условиях среды (Таб. 1), что видно из их рН-оптимумов и субстратной избирательности при окислении ряда фенольных соединений.

Были оптимизированы условия погруженного культивирования грибов *Myrothecium roridum* и *Curvularia geniculata* с использованием натуральных источников углерода и энергии, а также ряда органических и неорганических соединений с целью повышения лакказной активности грибов. Из культуральных жидкостей грибов, полученных в оптимальных условиях культивирования были выделены и охарактеризованы оксидазы. Исследование физико-химических и кинетических свойств очищенных оксидаз подтвердило их максимальную активность в нейтрально-щелочной области рН.

Показана способность выделенных ферментов трансформировать фенилпропаноиды с образованием полимерных производных, которые могут быть использованы в фармацевтике, в нейтральных условиях среды. Впервые из мицелия грибов рода *Myrothecium* и *Curvularia* выделены и идентифицированы ДНК последовательности

лакказных генов, а также определено филогенетическое родство полученных последовательностей с генами известных грибных лакказ.

Табл. 1. pH оптимум и субстратная избирательность оксидаз культуральной жидкости исследованных грибов

Субстрат	pH-оптимум		Удельная активность культуральной жидкости штаммов, Ед/мл ( $V_{\text{относ}}$ , %)			
			<i>Myrothecium roridum</i>		<i>Curvularia geniculata</i>	
	<i>Myrothecium roridum</i>	<i>Curvularia geniculata</i>	pH 5.0	pH 7.2	pH 5.0	pH 7.2
АБТК	4,3	2.5	37.2 (100.0)	4.6 (100.0/12,4*)	103.2 (100.0)	6.8 (100.0/(6.6*))
2,6-Диметоксифенол	6,5	7.0	4.5 (12.1)	13.2 (287.0/35.5*)	2.5 (2.4)	25.8 (379.4/(25.0*))
Сирингалдазин	7,0	7.0	0.0 (0.0)	4.2 (91.0/11.3*)	67.1 (65.0)	81.7 (1201.5/(79.2*))
Конифероловый спирт	н.о	6.5	2.2 (5.9)	3.7 (80.4/10.0*)	8.2 (7.9)	14.6 (214.7/(14.2*))
<i>n</i> -Кумаровый спирт	н.о	7.0	4.9 (13.2)	5.0 (108.7/13.4*)	0.0 (0.0)	1.0 (14.7/(1.0*))
Феруловая кислота	н.о	7.5	5.3 (14.3)	9.2 (200.0/24.7*)	8.3 (8.0)	39.3 (577.9/(38.1*))

\* Величина  $V_{\text{относ}}$  рассчитана относительно удельной активности оксидаз в культуральной жидкости штамма с АБТК при pH 5.0.

#### Литература

1. Elshafei A.M., Hassan M.M., Haroun B.M., Elsayed M.A., Othman A.M. Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC 345 //Advanced Life Sciences. – 2012. – V. 2. – P. 31–37.
2. Hao J., Song F., Huang F., Yang C., Zhang Z., Zheng Y., Tian X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye //Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 34. – P. 233–240.
3. Mate D. M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology //Microbial Biotechnology. – 2017. – V. 10. – P. 1457–1467.
4. Sakurai T., Kataoka K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase //The Chemical Record. – 2007. V. 7. – P. 220–229.
5. Мясоедова Н. М., Гасанов Н. Б., Черных А. М., Коломыцева М. П., Головлёва Л.А. Селективная регуляция продукции изоформ лакказы грибом *Lentinus strigosus* 1566. //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015 – Т. 51 № 2. – С. 221–228.

#### Адаптация *Desulfovibrio gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> к отрицательной температуре и высокой солености

*Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
ryzhmanova@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_148-150

Криопэги – древние высокоминерализованные закрытые водные экосистемы морского происхождения, обнаруженные в многолетнемерзлых отложениях Арктики на глубине нескольких десятков метров. Они характеризуются постоянными отрицательными температурами и высокой соленостью, и являются местом обитания психротолерантных и галотолерантных микроорганизмов [1-6].

Из криопэга полуострова Ямал (70°18'64"с.ш. 68°00'00"в.д.) недавно была выделена и описана новая психроактивная галофильная сульфатовосстанавливающая бактерия *Desulfovibrio gilichinskyi* K3S<sup>T</sup>, способная расти при отрицательных температурах [7].

Поскольку *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> является обитателем экосистемы с высоким уровнем минерализации (77.16 г/л) и постоянными отрицательными температурами, бактерия должна использовать ряд адаптационных механизмов, позволяющих функционировать в этих условиях. Цель настоящей работы состояла в анализе генома *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> для выяснения возможных механизмов молекулярной адаптации в естественной среде обитания.

Для штамма K3S<sup>T</sup> проведено секвенирование полного генома (U.S. DOE Joint Genome Institute), депонированного в JGI и GenBank под номерами IMG ID 2708742538 и FWZU00000000, соответственно. Размер генома составил 3962538 п.н. В геноме обнаружено 3648 генов, из них число генов кодирующих белки составило 3576, генов кодирующих ферменты 883, 72 рНК, среди которых только одна копия гена 16S рНК. Содержание Г+Ц пар в ДНК составило 42.3 мол. %.

Холодовая адаптация бактерий затрагивает различные механизмы, включающие изменения текучести клеточной мембраны, синтез криопротекторных соединений, преодоление низкотемпературного барьера для поглощения углерода, изменения аминокислотного состава и т.п.

Анализ жирных кислот клеточных стенок *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> показал высокий уровень ненасыщенных жирных кислот (59.8%), включая разветвленные изо/антеизо-жирные кислоты (20.6%). Кроме того, анализ геномных данных с использованием ресурсов JGI (<https://jgi.doe.gov/>) и PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>) позволил обнаружить ген десатуразы жирных кислот (EC 1.14.19.1), позволяющий увеличить соотношение ненасыщенных жирных кислот в составе клеточных стенок. Этот ген также обнаружен у *D. profundus*, *D. africanus* и *D. ferrophilus* со сходством аминокислотных последовательностей 73.33, 62.73 и 56.97%, соответственно. Увеличение уровня ненасыщенных жирных кислот приводит к повышению текучести мембраны, что крайне важно для роста бактерии в воде криопэга при постоянных отрицательных температурах.

Анализ геномных данных также показал снижение содержания ряда аминокислот (Arg, Gln, Ala и Pro), в то время как содержание аминокислот с гидрофобными остатками (Leu и Phe) было увеличено по сравнению с ближайшими мезофильными видами. Эти изменения также характерны для психрофильных представителей микробного мира.

Сочетание в экосистеме криопэга двух таких неблагоприятных факторов как отрицательная температура и высокая минерализация предполагает использование осмопротекторов, зачастую выполняющих и криопротекторную функцию. Анализ генома *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> позволил обнаружить гены транспортной системы глицин бетаина ABC-типа. Анализ аминокислотных последовательностей белков этой транспортной системы показал высокий процент гомологии (92.75-86.97%) с ближайшими родственниками *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> - *D. ferrireducens* и *D. frigidus* - также выделенными из арктических экосистем. Кроме того, в геноме *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> обнаружен ген *treZ* малтоолигосил-трегалоза трегалогидролазы, кодирующий белок TreZ (EC:3.2.1.141), участвующий в TreYZ пути биосинтеза трегалозы.

Таким образом, *D. gilichinskyi* K3S<sup>T</sup> разработал эффективные стратегии для выживания в среде с отрицательной температурой и высокой минерализацией. Транспорт

из окружающей среды глицин-бетаина и синтез трегалозы - наиболее распространенных микробных осмо/криопротекторов - защищает клетки от дегидратации и повреждающего действия низких температур. Изменение состава жирных кислот и аминокислотного состава позволяет поддерживать мембраны и жгутики в жидкокристаллическом состоянии с повышенной текучестью и пониженной вязкостью, что также защищает бактерию от повреждающего действия холода.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00831). Геномные данные получены U.S. DOE Joint Genome Institute в соответствии с контрактом № DE-AC02-05CH11231.*

#### Литература

1. Gilichinsky D, Rivkina E, Bakermans C, Shcherbakova V, Petrovskaya L *et al.* Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol Ecol* 2005 53: 117-128.
2. Печерицына С.А., Щербакова В.А., Холодов А.Л., Акимов В.Н., Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Ривкина Е.М. Микробиологический анализ криопэггов Варандейского полуострова на побережье Баренцева моря. *Микробиология*, 2007. Т. 76. № 5. С. 694-701.
3. Shcherbakova VA, Chuvilskaya NA, Rivkina EM, Pecheritsyna SA, Laurinavichius KS *et al.* Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles* 2005 9: 239-246.
4. Bakermans C, Ayala-del-Río H, Ponder MA, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D *et al.* *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 1285-1291.
5. Щербакова ВА, Чувильская НА, Ривкина ЕМ, Печерицына СА, Суетин СВ *et al.*. Новая галотолерантная бактерия из криопэга в вечной мерзлоте: описание *Psychrobacter muriicola* sp. nov. *Микробиология* 2009 78: 98-105.
6. Shcherbakova V, Chuvilskaya N, Rivkina E, Demidov N, Uchaeva V *et al.* *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013 63: 4421-4427.
7. Ryzhmanova Y, Abashina T, Petrova D, Shcherbakova V. *Desulfovibrio gilichinskyi* sp. nov., a cold-adapted sulfate-reducing bacterium from a Yamal Peninsula cryopeg. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019 69(4): 1081-1086.

#### **Воздействие метаболитов *Raenibacillus peoriae* MBV-2 на раковые клетки предстательной железы линий LNCaP и PC3.**

<sup>1,2</sup>Рысцов Г.К., <sup>1</sup>Абашина Т.Н., <sup>1</sup>Антипова Т.В., <sup>1</sup>Баскунов Б.П., <sup>1</sup>Лауринавичюс К.С.,  
<sup>1,2</sup>Земскова М.Ю., <sup>1</sup>Вайништейн М.Б.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

<sup>2</sup>Московский областной университет, г. Москва; gleb.8.ristsoff@gmail.com,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_150-152

Ранее было предположено, что эпифитные бактерии могут продуцировать экзометаболиты подавляющие рост клеток эукариотов, в том числе опухолевых клеток (Abashina *et al.*, 2016). В поддержку этой гипотезы был выделен эпифитный штамм

*Paenibacillus* sp. MBV-2, подавляющий рост некоторых мицелиальных грибов (Абашина и др., 2018). В настоящей работе представлены результаты поиска активных экзометаболитов штамма и проверка их воздействия на опухолевые клетки.

В качестве испытуемых объектов использовали клетки рака простаты LNCaP и PC3, которые культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% бычьей сывороткой (FBS), стрептомицином и пенициллином. Клетки поддерживали при 37°C при 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. Анализ роста клеток проводили в динамике в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с использованием xCELLigence (DP Instrument, ACEA Biosciences). Система xCELLigence включает 16-луночные электронные сенсорные планшеты для исследований роста клеток. Дно лунок планшетов покрыто золотыми электродами, раковые клетки при росте прикрепляются к золотым электродам, их адгезия определяет протекание электрического тока, рост клеток в соответствии с принятой методикой рассчитывали на основе изменений электрического сопротивления при помощи программного обеспечения устройства.

В ходе проведения работ испытуемый штамм MBV-2 был идентифицирован как *Paenibacillus peoriae*. Антифунгальные свойства среды культивирования с экзометаболитами были подтверждены на ряде штаммов мицелиальных грибов. В среде культивирования методами хроматографии и масс-спектрометрии были выявлены и идентифицированы пептиды с молекулярными массами (M) 883, 897, 948 и 961 Да, сходные с фузарицидинами, подавляющими плесневые грибы (Патент WO / 2016/020371, 2014) и 2,12-диметилтетрадекановая кислота (M=256 Да).

Воздействия продуцируемой кислоты и экстракта культуральной среды на раковые клетки показано на рисунке 1. Показано отсутствие значительного ингибирующего действия 2,12-диметилтетрадекановой кислоты на рост клеток рака предстательной железы. Культивирование опухолевых клеток в присутствии экстракта приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток LNCaP и PC3 в зависимости от вносимой дозы и времени культивирования.

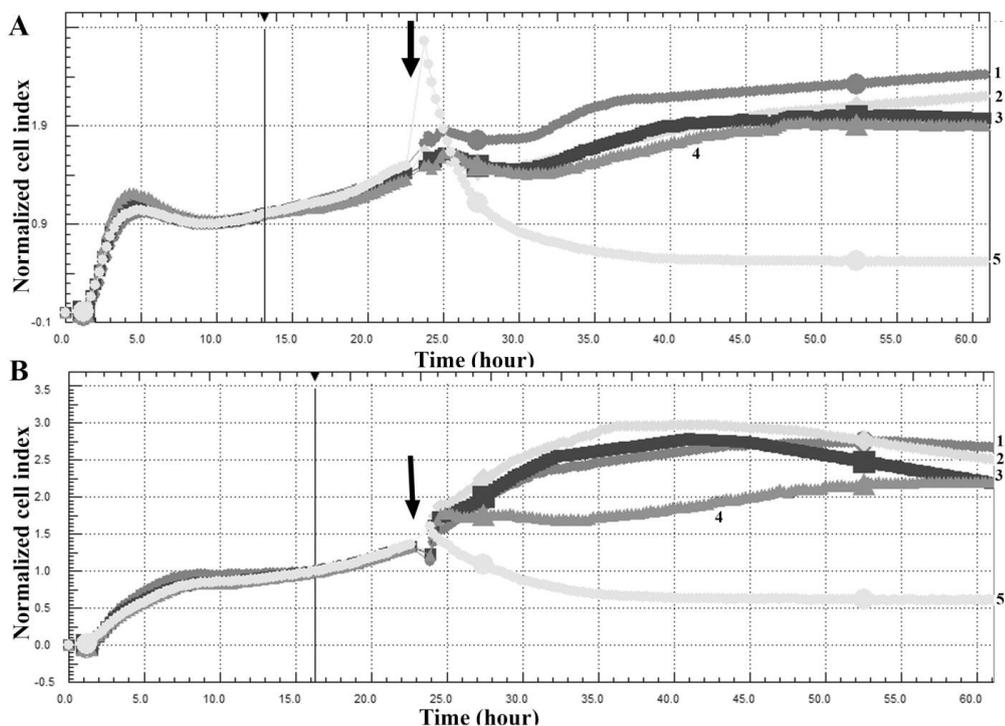


Рис. 1 Воздействия выделенной 2,12-диметилтетрадекановой кислоты и бутанольного экстракта культуральной среды *P. peoriae* MBV-2 на рост клеток LnCaP (A) и PC3 (B) по данным системы xCELLigence. Стрелка на графике указывает время добавления кислоты и

экстракта. Ось абсцисс - время культивирования, часы; ось ординат - нормализованный клеточный индекс. 1 - контроль; 2 - кислота, 10 мг/л; 3 - кислота, 20 мг/л; 4 - экстракт, 10 мг/л; 5 - экстракт - 100 мг/л.

При внесении 10 мг/л экстракта снижение клеточной адгезии наблюдали уже через 2 часа после добавления веществ, на что указывало 4,88% снижение значений клеточного индекса для LNCaP и 9,81% для клеток PC3. Через 24 часа значения индекса снижались до 25,9% для LNCaP и 32,18% для клеток PC3 по сравнению с контролем.

При внесении 100 мг/л экстракта снижение значений клеточного индекса составило - 81,1% для LNCaP и 76,64% для клеток PC3 относительно контроля. Гибель раковых клеток была также подтверждена прямыми микроскопическими наблюдениями.

Таким образом, впервые показано, что экзометаболиты *P. peoriae* MBV-2 обладают цитотоксическими свойствами для клеток рака предстательной железы.

#### Литература

1. Abashina T., Laurinavichius K., Vainshtein M. Suppositional area for the search of bacterial products for anticancer therapy. *Medical Hypotheses*. 2016. V. 92. P. 54–56. DOI: 10.1016/j.mehy.2016.04.036
2. Абашина Т.Н., Шорохова А.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М., Вайнштейн М.Б. Подавление фитопатогенных бактерий и мицелиальных грибов метаболитами *Raenibacillus* sp. MBV-2. *Актуальная биотехнология*. 2018. Вып. 3 (26). С. 357-361.
3. Патентная заявка «Противогрибковые штаммы *Raenibacillus*, соединения типа фузарицидинов и их применение». WO / 2016/020371. Дата приоритета 04.08.2014.

### **Влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост микроорганизма штамма *Rhodococcus* sp. X5 в среде с добавлением гексадекана, углеводорода нефти, и повышенной солёностью**

***Семёнова К.Р. Акатова Е.В.***

*Тульский государственный университет*

Нефтяная промышленность относится к числу основных отраслей – загрязнителей, нефть и продукты ее переработки попадают в окружающую среду при бурении, авариях транспортных средств, порывах нефтепроводов, от загрязнения нефтью страдают как морские побережья, так и моря. При очистке почв и вод, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, широкое применение нашли биотехнологии, основанные на способности микроорганизмов использовать нефть и ее продукты в качестве единственного источника углерода. В совокупности с биопрепаратами культур углеводородокисляющих микроорганизмов применение гуминовых веществ дает хороший экологический эффект, который заключается в быстром восстановлении естественных геобиохимических процессов почв. Взаимодействуя с микроорганизмами, гуминовые вещества могут влиять на рост, подавляя или стимулируя его, способны защищать живые клетки от токсического воздействия природного и антропогенного характера, а так же могут служить источником питания для микроорганизмов. В тоже время гуминовые вещества могут негативно действовать на функционирование клетки, нарушая обменные процессы. (Рогозиа, 2014)

Цель данной работы - оценить влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост микроорганизмов-нефтедеструкторов на минеральной среде с гексадеканом – углеводородом нефти, и повышенной концентрацией соли (5%).

В работе использовался штамм микроорганизмов *Rhodococcus sp. X5*, который входит в состав биопрепарата «МикроБак» (Филонов, 2016), используемый при очистке почв и вод от нефтезагрязнений, а так же гуминовые вещества, выделенные из торфа в Тульской области, а именно сфагнового переходной (СПТ), сфагновый верховой (СВТ), черноольховый низинный (ЧНТ) и тростниковый низинный торфа (ТТ).

Влияния гуминовых веществ различного происхождения на рост бактерий оценивали по основным физиологическим параметрам: удельная скорость роста и время генерации биомассы (рис. 1 и табл. 1).

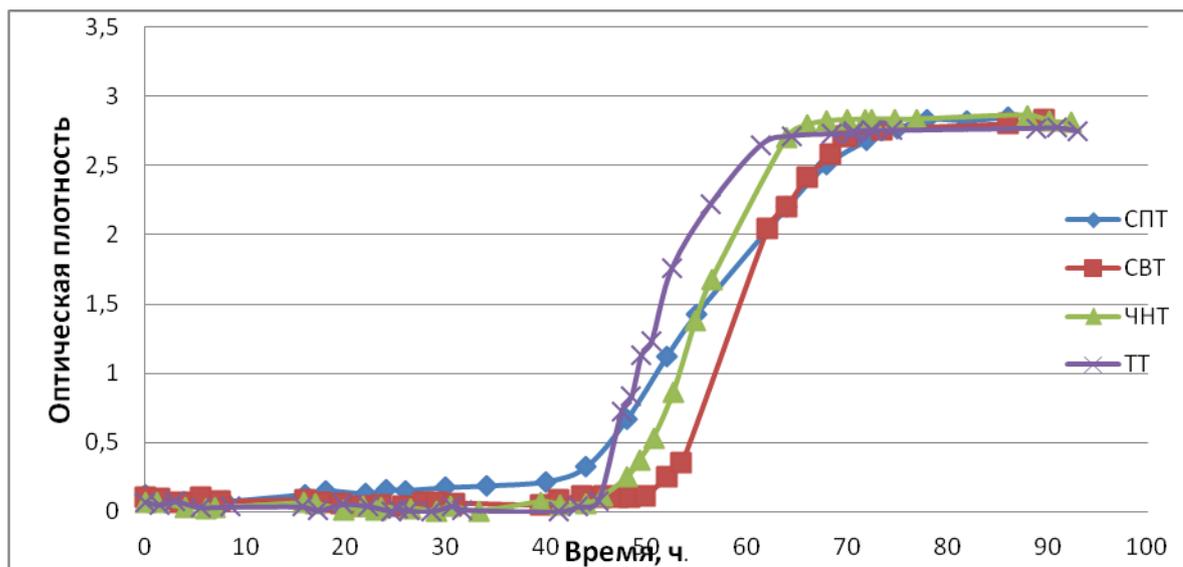


Рис.1 Кривые роста микроорганизмов *Rhodococcus sp. X5* на среде Эванса с добавлением гексадекана (2%) в условиях повышенной солености среды и в присутствии гуминовых веществ (СПТ, СВТ, ЧНТ и ТТ).

Табл. 1. Основные параметры роста микроорганизмов штамма *Rhodococcus sp. X5* с наличием гуминовых веществ различного происхождения

	Контроль*	СПТ	СВТ	ЧНТ	ТТ
Удельная скорость роста культуры, ч <sup>-1</sup>	0,14	0,13	0,23	0,27	0,25
Время удвоения биомассы, ч	4,9	5,3	3,1	2,6	2,8

\*Контроль-среда Эванс с гексадеканом и 3% содержанием соли, без добавления каких-либо гуминовых веществ.

Результаты исследования (рис.1 и табл.1) показали, что добавление в среду гуминовых веществ увеличило продолжительность лаг-фазы в сравнение с контролем: в случае с СПТ и ТТ в 1,5 раза, СВТ- в 2,4 раза и ЧНТ- 2,1 раза. Это свидетельствуют о том, что гуминовые вещества затрудняют процесс адаптации культуры в сложной минеральной среде. Продолжительность экспоненциальной фазы значительно сократилась: в случае с

СВТ в 3 раза, ЧНТ - 2,8 раза, ТТ – 2,6 раза и СПТ – 2,4 раза. Выход на стационарную фазу в случае с СПТ и СВТ не изменился, а ЧНТ и ТТ сократился на 5 часов.

Все гуминовые вещества, за исключением ЧНТ, оказало негативное влияние на рост микроорганизмов, но не значительное. И только гуминовые вещества ЧНТ оказали положительный эффект на рост микроорганизмов. Гуминовые вещества не могут служить источником энергии для микроорганизмов, но находясь в среде они образуют вокруг клеток оболочку, которая смягчает негативное воздействие среды на клетку (повышенная солёность), но в то же время эта защитная оболочка препятствует прохождению гидрофобных субстратов в клетку, что сказывается на росте микроорганизмов.

#### Литература

1. Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моршунов П.А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов НАФТОКС 12-Р и НАФТОКС 48-У// ФГУП «ВНИГРИ», 2014г.
2. Филонов А.Е. Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата; автореферат, Пушкино 2016.

### **Обнаружение бактериоциноподобных веществ у ризосферных псевдомонад**

**Сиунова Т.В., Сизова О.И., Анохина Т.О., Кочетков В.В.**

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН; siunova@mail.ru,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_154-156

Ризосфера (совокупность корневой системы растений с почвой) – это сложная экологическая ниша, заселенная полезными, вредными или нейтральными по отношению к растению микроорганизмами. В настоящее время нерациональная химизация в растениеводстве приводит к вытеснению полезных микроорганизмов из их природной среды обитания. Поэтому восстановление естественного биологического состояния ризосферы за счет интродукции в нее почвенных микроорганизмов является актуальной проблемой. При разработке биопрепаратов, включающих несколько микроорганизмов, важно учитывать их различные характеристики. Целью работы было изучение совместимости различных штаммов PGPR *Pseudomonas* в условиях периодического культивирования и в ризосфере растений, обусловленной биосинтезом бактериоциноподобных веществ.

Из ризосферы растений было выделено 6 штаммов: *P. chlororaphis(aureofaciens)* Kr31 и *P. brassicacearum* Kr21, *P. lurida* P6-1 и *P. putida* P8-1, *P. chlororaphis* Or3-3, *P. fluorescens* IC7. Эти штаммы были отнесены к группе PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений). Выделенные бактерии обладали набором характерных для данной группы свойств: синтезировали фитогормоны, ПАВ, растворяли трудно-растворимые фосфаты, хорошо колонизировали корни различных растений и стимулировали рост корней проростков. Кроме того, штаммы *P. chlororaphis(aureofaciens)* Kr31, P4-1 и *P. chlororaphis* Or3-3 и синтезировали антибиотикоподобные соединения феназинового ряда, за счет которых подавляли рост фитопатогенных грибов. Методом диффузии в агар выяснилось, что в культуральной жидкости шести штаммов также содержатся бактериоциноподобные вещества (БПВ), подавляющие рост других псевдомонад группы PGPR. Чувствительными к БПВ оказались

только четыре штамма (из 17 протестированных), относящихся к виду *P. chlororaphis(aureofaciens)* BS1393, OV17, IG1, P4-1 (табл. 1). Штаммы данного вида синтезируют окси-производные феназина, обеспечивающие оранжевую пигментацию колоний. Это дало возможность идентифицировать их при высеве на агаризованную среду LB после совместного выращивания с другими штаммами в жидкой культуре. Например, через 18 часов совместного культивирования *P. chlororaphis* Or3-3 и *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 титр чувствительного штамма P4-1 ( $8.0 \times 10^7$  КОЕ/мл) был почти на два порядка ниже, чем у продуцента БПВ – Or3-3 ( $1.6 \times 10^{10}$  КОЕ/мл). При совместном культивировании *P. lurida* P6-1 и *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 титр чувствительного штамма ( $1.6 \times 10^8$  КОЕ/мл) был на порядок ниже по сравнению с его титром в монокультуре ( $3 \times 10^9$  КОЕ/мл) и незначительно понижался по сравнению с титром продуцента БПВ – P6-1 ( $5.8 \times 10^8$  КОЕ/мл).

Для выяснения того, происходит ли подавление штаммов непосредственно в ризосфере, стерильные семена пшеницы инокулировали штаммами: *P. chlororaphis* Or3-3 + *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 (опыт 1); *P. lurida* P6-1 + *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 (опыт 2). Через 14 сут выращивания в стерильном песке, увлажненном минеральной средой Мурашига-Скуга, проводили высевы с корня растения, разделяя его на три части (верхнюю, среднюю и нижнюю). Эксперименты проводили в 3х-кратной повторности. Количество бактерий, выросших на агаризованной среде LB, пересчитывали на 1 см корня. Оказалось, что в данных условиях не происходит подавление штамма *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 продуцентами БПВ – *P. chlororaphis* Or3-3 и *P. lurida* P6-1. Во всех частях корня титр инокулированных бактерий достигал  $10^6$  КОЕ/см, при этом, их соотношение было постоянным (1 : 1). Поскольку продукция БПВ бактериями наблюдалась в богатой среде LB, вероятно, в вегетационных экспериментах без внесения дополнительных источников углерода было недостаточно питательных веществ в составе корневых экссудатов для продукции БПВ. Поэтому планируется проведение более длительных экспериментов с растениями на различных почвах.

Табл. 1. Подавление штаммов PGPR *Pseudomonas* (метод диффузии в агар)

№	Бесклеточный супернатант штамма	Тестируемые штаммы PGPR							
		1	2	3	4	5	6	7	8–17**
		16H	BS1393	OV17	Kr31	P4-1	IC7	IG1	OV29–P8-2
1	<i>P. chlororaphis</i> 16H*								
2	<i>P. chlororaphis</i> 1393*								
3	<i>P. chlororaphis</i> OV17*								
4	<i>P. chlororaphis</i> Kr31*		+	+		±		±	
5	<i>P. chlororaphis</i> P4-1*								
6	<i>P. fluorescens</i> IC7		+	+		±		±	
7	<i>P. chlororaphis</i> IG1*								
8	<i>P. fluorescens</i> OV29								
9	<i>P. putida</i> O9-10								
10	<i>P. fluorescens</i> A1								
11	<i>P. chlororaphis</i> Or3-3		+	+		±		±	
12	<i>P. brassicacearum</i> Kr21		±	±		±		±	

13	<i>P. protegens</i> 38a							
14	<i>P. fluorescens</i> P2-1							
15	<i>P. protegens</i> P4-2							
16	<i>P. lurida</i> P6-1		±	+		±	±	
17	<i>P. putida</i> P8-2		±	±			±	

Примечания. \*Штамм *P. chlororaphis* ранее относился к виду *P. aureofaciens*. \*\*8–17 – Столбцы не показаны из-за отсутствия подавления роста штамма культуральной жидкостью. Номера в первом столбце (бесклеточный супернатант штамма) соответствуют номерам в строке (тестируемый штамм). (±) зона подавления ≤5 мм; (+) зона подавления ≥5 мм; пустые ячейки – подавление отсутствует.

Бесклеточные супернатанты штаммов-продуцентов БПВ проверяли на чувствительность к ферментам, pH и тепловой обработке. Обработка РНКазой, α-амилазой и липазой С не влияла на антимикробную активность. Обработка протеиназой К приводила к потере активности, однако у штамма *P. chlororaphis* Or3-3 она сохранялась. Активность отсутствовала после прогревания при 60°C в течение 30 мин, при понижении pH до 2.0; в щелочных условиях (pH 9.0) активность сохранялась только у двух штаммов Kr21 и Kr31. Полученные результаты предполагают различную природу БПВ у выделенных ризосферных штаммов и требуют дальнейшего изучения.

### **Синтез и характеристика наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров**

<sup>1</sup>*Смирнов И.В.*, <sup>2</sup>*Лисов А.В.*, <sup>3</sup>*Казаков А.С.*, <sup>2</sup>*Звонарев А.Н.*, <sup>2</sup>*Земскова М.Ю.*

<sup>1</sup>Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов ФИЦ ПНЦБИ РАН

<sup>3</sup>Институт биологического приборостроения ФИЦ ПНЦБИ РАН; ivan\_cmironov\_98@mail.ru,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_156-158

Традиционные варианты лечения рака фармакологическими препаратами имеют определенные ограничения, включая низкую селективность действия, недостаточную концентрацию лекарственного средства при достижении опухолевых тканей, цитотоксичность для здоровых клеток. Наночастицы как новые средства доставки лекарств в клетки опухоли целевым образом в настоящее время рассматриваются как одни из важнейших вариантов решения этих проблем.

В последние годы активно развиваются способы получения лигниновых наночастиц. Недавно были получены и охарактеризованы биоразлагаемые наночастицы на основе лигнина [1]. Опубликованы работы, в которых данные частицы были использованы для успешной доставки лекарственных препаратов в раковые клетки [2, 3]. Схожими по строению с лигнином являются лигнин-подобные полимеры. Такие биополимеры могут быть получены с использованием ферментативного синтеза из фенольных мономеров в результате действия лакказы, полученной из грибов базидиомицетов [4]. Также возможен химический синтез полимеров путем окисления фенольной части мономера. Эти полимеры, по сравнению с натуральным лигнином, обладают рядом преимуществ: предсказуемость и определенность молекулярной структуры, дешевизна получения и возможность внесения модификаций в химический состав соединений в ходе синтеза.

Целью данной работы являлось получение стабильных наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров, синтезированных ферментативным и химическим путем, и оценка их физико-химических свойств.

В задачи данного исследования входило: (1) выделение индуцированной  $\text{Cu}^{2+}$  лакказы из гриба *Cerrena unicolor* (ВКМ F-3196) методами высаливания 90%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , гель-фильтрации (Superdex™ 200) и ионообменной хроматографии (Toypearl DEAE-650 и UNO-Q); (2) синтез полимеров из 12 фенольных мономеров с использованием полученного фермента и с помощью окислительного химического синтеза с  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (3) образование наночастиц посредством диализа водонерастворимых полимеров против Milli-Q воды, оценка размеров сформированных наночастиц (Z-average), индекса полидисперсности (PDI) и стабильности в Milli-Q воде и фосфатном буфере (PBS, pH 7.2) посредством измерения дзета-потенциалов частиц с использованием метода динамического светорассеяния (DLS) на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS; (4) оценка эффективности проникновения в клетки человека наночастиц, загруженными прижизненным флуоресцентным красителем Vybrant CFDA SE и инкубированные с клетками рака груди MDA-MB-231. Визуализация проникновения и компартиментализация наночастиц несущих флуоресцентный краситель опухолевыми клетками осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа.

По результатам работы было показано, что наиболее оптимальным размером (100-150 нм) и физико-химическими свойствами обладают наночастицы, синтезированные ферментативным путем из полиферуловой, полигентизиновой кислот и их гетерополимеров (3:1, феруловая и гентизиновая кислоты соответственно, Таблица 1). Наночастицы, сформированные из полимеров, полученных в результате химического синтеза с применением  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , имеют большую вариабельность по размеру. Наночастицы из полимеров гентизиновой и феруловой кислот при инкубировании в PBS стабильны, в отличие от гетерополимерных частиц, которые увеличиваются в размере почти в 10 раз.

При исследовании интернализации наночастиц в опухолевые клетки было показано, что частицы перед проникновением адсорбируются на мембране клеток, а после 6-часового инкубирования проходят через клеточную мембрану и концентрируются в определенных компартментах клетки, предположительно в аппарате Гольджи.

Полученные данные свидетельствуют о преимуществах использования лакказы в качестве катализатора полимерных соединений, которые возможно использовать для образования эффективных и стабильных наночастиц. На основе предлагаемых средств доставки противораковых агентов возможна разработка новых подходов к противоопухолевой терапии, таких как: комплексная терапия с использованием смесей наночастиц, несущих разные фармакологические соединения, целевая доставка лекарств исключительно в клетки опухоли, когда наночастицы будут модифицированы для проникновения в определенный тип клеток.

Табл. 1. Физико-химические свойства наночастиц

Полимеры, полученные ферментативным синтезом и использованные для формирования наночастиц	Стабильность наночастиц  (Дзета-потенциал, мВ)	Диаметр (Z-average, нм) и распределение по размеру (PDI) наночастиц  в Milli-Q воде		в PBS			
				5 минут		60 минут	
		Z-average,	PDI	Z-average, d нм	PDI	Z-average, d нм	PDI

		d нм					
феруловый полимер (15мМ+0,36 Е/мл)	-32,2±0,4	107,79±4,95	0,094±0,033	145,50	0,257	188,10	0,367
гентизиновый полимер (40 мМ+0,06 Е/мл)	-25,9±3,6	131,10±13,55	0,259±0,071	193,30	0,432	128,42	0,272
3:1 гетерополимер (15 мМ+0,06 Е/мл)	-30,4±8,8	75,92±9,32	0,376±0,127	386,00	0,268	701,00	0,272

### Литература

1. Frangville C, Rutkevičius M, Richter AP, Veleв OD, Stoyanov SD, Paunov VN. Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles. Chemphyschem., 2012, 13(18), 4235-43.
2. Figueiredo P, Lintinen K, Kiriazis A, Hynninen V, Liu Z, Bauleth-Ramos T, Rahikkala A, Correia A, Kohout T, Sarmiento B, Yli-Kauhaluoma J, Hirvonen J, Ikkala O, Kostianen MA, Santos HA. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. Biomaterials, 2017, 121, 97-108.
3. Figueiredo P, Sipponen H, Lintinen K, Correia A. Preparation and characterization of dentin phosphophoryn derived peptide-functionalized lignin nanoparticles for enhanced cellular uptake. Small, 2019, 1901427.
4. Su J, Fu J, Wang Q, Silva C, Cavaco-Paulo A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. Crit. Rev. Biotechnol., 2018, 38(2), 294-307.

## Конструирование системы экспрессии для *in vivo* N-концевого ацелирования рекомбинантных белков

Соколов А. С., Лантева Ю. С.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН; 212sok@gmail.com

Большинство белков эукариот подвергается N-концевому ацелированию, что может существенным образом изменять их структурные и функциональные свойства [1]. Рекомбинантные белки эукариот, нарабатываемые в бактериях, часто не содержат данную модификацию. В этой связи актуальна разработка метода N<sup>α</sup>-ацелирования (N<sup>α</sup>-АЦ) рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии. N<sup>α</sup>-АЦ катализируют специфичные ферменты - N-концевые ацелилтрансферазы (АТ), различающиеся по субстратной специфичности, которая зависит от N-концевой аминокислотной последовательности ацелилируемого белка. АТ эукариот являются, как правило, мультисубъединичными ферментами, в то время как их бактериальные аналоги содержат по одной субъединице [2]. В связи с этим, перспективным представляется

использование N-концевых ацетилтрансфераз *E. coli* для N<sup>α</sup>-АЦ рекомбинантных белков эукариот при их наработке в *E. coli*.

Гены N-концевых ацетилтрансфераз *E. coli* RimI, RimL и RimJ индивидуально клонированы нами в экспрессионный вектор pET-Duet и получены плазмиды pET-Duet-RimI, pET-Duet-RimJ и pET-Duet-RimL. Вектор pET-Duet содержит в своем составе два гибридных промотора T7/lac и сконструирован таким образом, что позволяет проводить наработку в клетках одновременно двух белков. На следующем этапе работы в сконструированные нами плазмиды с генами АТ мы «подклонировали» гены целевых белков, N<sup>α</sup>-АЦ которых необходимо было провести (белки семейства «EF-руки»). В результате мы получили плазмиду с двумя генами: N-концевой ацетилтрансферазы и целевого белка (парвальбумин или белки S100). Далее проводили их совместную экспрессию в штамме BL21(DE3) *E. coli*. Были подобраны оптимальные условия культивирования клеток. Целевые белки были выделены, очищены и определен уровень их N-концевого ацетилирования при помощи масс-спектрометрии.

Таким образом, на основе вектора pET-Duet нами сконструирована система для N-концевого ацетилирования белков семейства «EF-руки» в условиях *in vivo*. Предложенный подход может быть распространен на другие рекомбинантные белки эукариот, получаемые в бактериальных системах экспрессии, что позволит изучать и использовать при решении прикладных задач белки в форме, в большей степени приближенной к природной.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00701.*

#### Литература

1. Drazic, A., et al. The world of protein acetylation // Biochim. Biophys. Acta. - 2016. – V. 1864: P 1372-1401.
2. Favrot, L., J.S. Blanchard, and O. Vergnolle, Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation // Biochem. - 2016. – V. 23. -P 989–1002.

### **Определение геномной последовательности штамма *Pseudomonas putida* AK5**

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
SLS@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_159-160

Штамм *Pseudomonas putida* AK5 был выделен из образцов нефтешламов предприятия «Нижнекамскнефтехим», он характеризуется способностью утилизировать нафталин через салицилат и гентизат. Было установлено наличие в этом штамме неконъюгативной плазмиды биodeградации pAK5 группы несовместимости P-7, на которой расположены «классический» *nah1*-оперон, контролирующий конверсию нафталина в салицилат и *sgp*-оперон, контролирующий превращение салицилата в гентизат. Дальнейший метаболизм гентизата до интермедиатов цикла Кребса у *P. putida* AK5 обеспечивается участием как плазмидных, так и хромосомных генов. Строение базового репликона плазмиды pAK5 на 99.9% идентично строению базового репликона IncP-7 плазмиды pND6-1 из штамма *P. putida* ND6, выделенного в Китае из промышленных сточных вод и, как и *P. putida* AK5, способного к деградации полициклических ароматических углеводов.

Для определения геномной последовательности штамма *P. putida* AK5 из геномной ДНК была приготовлена библиотека для секвенирования по методологии single end reads на приборе Illumina HiSeq 2x100. Полученный набор ридов при помощи ассемблера Unicycler [1] был преобразован в набор из 154 контигов (N50=134,947, L50=14). В качестве референсного генома был выбран геном *P. putida* F1 (GenBank acc. no. NC\_009512.1). Используя метод алгебраических перестановок, из набора контигов был получен геномный скаффолд. Предположительный размер генома штамма *P. putida* AK5 – 6057.7 т.п.н., из которых 5922.9 т.п.н. приходится на хромосому и 134.8 т.п.н. – на плазмиду pAK5.

Проведено предварительное аннотирование генома *P. putida* AK5 при помощи RAST tool kit (RASTtk) [2]. Геном содержит 5736 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 51 ген тРНК и 3 гена рибосомальных РНК (рРНК). Среднее значение G+C у генома *P. putida* AK5 равно 61.59%, что согласуется с известными данными для вида *P. putida*. Из аннотированных 5736 белок-кодирующих последовательностей 4549 имеют определенное функциональное значение, а 1187 CDS относятся к гипотетическим белкам, чья функциональная роль требует более детального изучения.

#### Литература

1. Wick, Ryan R. and Judd, Louise M. and Gorrie, Claire L. and Holt, Kathryn E. (2016). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. [doi:10.1101/096412]
2. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, et al. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. Sci Rep 5:8365.

### **Оптимизация процесса получения экзополисахаридов при погруженном культивировании *Ganoderma lucidum***

***Тихомирова Т.С., Тараскевич М.Р.***

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, tts05@mail.ru

Мицелиальный гриб *Ganoderma lucidum* является продуцентом большого количества биологически активных веществ, среди которых наиболее известными считаются некрахмальные полисахариды и тритерпены (ганодеровые кислоты, люцидон). Согласно многочисленным исследованиям, данные метаболиты обладают противовоспалительными [1], противоопухолевыми [2] и антиоксидантными свойствами [3], что позволяет применять их в терапии таких заболеваний как гастрит [4], диабет [5], атеросклероз [6], гепатит [7] и т.д.

Некрахмальные полисахариды, получаемые с использованием *G. lucidum*, подразделяют на два типа: эндо- и экзополисахариды. Основным источником эндополисахаридов (ЭнПС) являются плодовые тела и мицелиальная биомасса. Процесс получения ЭнПС подразумевает измельчение биомассы с последующей щелочной и кислотной экстракцией, что делает его трудоемким и дорогостоящим. Экзополисахаридами (ЭПС) называют водорастворимые некрахмальные полисахариды, получаемые путем спиртового осаждения из культуральной жидкости при погруженном культивировании мицелия *G. lucidum*. Данный подход отличается простотой и эффективностью. Выход ЭПС зависит

от выбранного субстрата и может быть повышен за счет оптимизации компонентного состава питательной среды и условий культивирования.

Наиболее распространенным субстратом для получения ЭПС является глюкоза. Для того, чтобы снизить экономические затраты и себестоимость конечного продукта также применяются различные отходы пищевого производства, такие как соевая [8] или кукурузная мука, отруби [9] или меласса [10]. В данной работе в качестве источника углерода при погруженном культивировании *G.lucidum* использовался пшеничный крахмал. Оптимизация процесса культивирования проводилась методом дробного факторного эксперимента (Бокса-Хантера), в котором использовалась питательная среда следующего состава: пшеничный крахмал (А), NH<sub>4</sub>Cl (В), CaCl<sub>2</sub> (С), 0.55 г/л MgSO<sub>4</sub>, 0.05 г/л тиамин, 0.9 г/л КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0.05 г/л К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>·3Н<sub>2</sub>О, начальный рН 4.1. Содержание крахмала, NH<sub>4</sub>Cl и CaCl<sub>2</sub> регламентировалось матрицей планирования эксперимента (Табл. 1). Период культивирования составлял 9 суток.

Табл. 1. Матрица планирования и результаты оптимизации (СДК и ЭПС) методом дробного факторного эксперимента (Бокса-Хантера)

№ пп	Значения факторов эксперимента, г/л			СДК, %	ЭПС, мг/л	D
	Пшеничный крахмал (А)	NH <sub>4</sub> Cl (В)	CaCl <sub>2</sub> (С)			
1	10	1	2	13.7 ± 5	97.6 ± 31.3	0
2	30	1	0	36.2 ± 7.1	247.3 ± 17.6	1
3	10	3	0	14.3 ± 5	119.4 ± 20.8	0.062379
4	30	3	2	33.9 ± 3.3	224.1 ± 28.1	0.871875
0	20	2	1	16.6 ± 2.4	121.1 ± 10.2	0.142386

В ходе эксперимента степень деградации крахмала (СДК) и конечная концентрация ЭПС в культуральной жидкости увеличились с 13.7±5% до 36.2±7.1% и с 97.6±31.3 мл/л до 247.3±17.6 мл/л соответственно. Полученные данные были использованы для составления следующих регрессионных уравнений первого порядка:

$$\text{ЭПС} = 150.2 + 63.56 \cdot A - 0.27 \cdot B - 11.17 \cdot C; R^2 = 0.7863$$

$$\text{СДК} = 21.16 + 10.53 \cdot A - 0.61 \cdot B - 0.71 \cdot C; R^2 = 0.8033$$

Как следует из уравнений, значимыми являются коэффициенты, соответствующие фактору А (пшеничный крахмал). Отсюда следует, что содержание крахмала в питательной среде прямо пропорционально СДК и конечной концентрации ЭПС. Полученные данные соответствуют значениям функции желательности D. Был определен следующий оптимальный состав питательной среды (№2) для погруженного культивирования *G.lucidum*: 30 г/л пшеничный крахмал, 1 г/л NH<sub>4</sub>Cl, 0.55 г/л MgSO<sub>4</sub>, 0.05 г/л тиамин, 0.9 г/л КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0.05 г/л К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>·3Н<sub>2</sub>О, начальный рН 4.1. Масштабирование процесса культивирования проводилось с использованием лабораторного биореактора ЛБ-1 (0.3 л), разработанного на базе ИБП РАН. В данном реакторе осуществляется перколяционное контурное перемешивание. Для увеличения площади массообмена применялись насадки. В результате, выход ЭПС составил 234.1 мл/л при СДК 26.7%. Следует отметить, что при D равной 0.87 (среда №4) содержание NH<sub>4</sub>Cl и CaCl<sub>2</sub> в среде было максимальным. Поскольку коэффициенты регрессии для данных факторов незначимы, мы не можем оценить их влияние на зависимые параметры. В связи с этим, дальнейшая оптимизация методами второго порядка позволит уточнить полученные данные и повысить эффективность процесса.

## Литература

1. Bhardwaj N., Katyal P., Sharma A.K. Suppression of inflammatory and allergic responses by pharmacologically potent fungus *Ganoderma lucidum* // *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2014. Vol. 8, № 2. P. 104–117.
2. Sohretoglu D., Huang S. *Ganoderma lucidum* Polysaccharides as An Anti-cancer Agent // *Anticancer Agents Med Chem.* 2018. Vol. 18, № 5. P. 667–674.
3. Živković L., Bajić V., Bruić M., Borozan S., Popić K., Topalović D., Santibanez J., Spremo-Potparević B. Antigenotoxic and antioxidant potential of medicinal mushrooms (Immune Assist) against DNA damage induced by free radicals-an in vitro study // *Mutat. Res.* 2019. Vol. 845. P. 403078.
4. Park J.-H., Jang K.-J., Kim C.-H., Kim J.-H., Kim Y.-K., Yoon H.-M. *Ganoderma Lucidum* Pharmacopuncture for Teating Ethanol-induced Chronic Gastric Ulcers in Rats // *J Pharmacopuncture.* 2015. Vol. 18, № 1. P. 72–78.
5. Xiao C., Wu Q., Xie Y., Tan J., Ding Y., Bai L. Hypoglycemic mechanisms of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 in db/db mice via RNA-seq and iTRAQ // *Food Funct.* 2018. Vol. 9, № 12. P. 6495–6507.
6. Xu Y., Zhang X., Yan X.-H., Zhang J.-L., Wang L.-Y., Xue H., Jiang G.-C., Ma X.-T., Liu X.-J. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 135. P. 706–716.
7. Zhao C., Fan J., Liu Y., Guo W., Cao H., Xiao J., Wang Y., Liu B. Hepatoprotective activity of *Ganoderma lucidum* triterpenoids in alcohol-induced liver injury in mice, an iTRAQ-based proteomic analysis // *Food Chem.* 2019. Vol. 271. P. 148–156.
8. Liu S.-R., Zhang W.-R. Optimization of submerged culture conditions involving a developed fine powder solid seed for exopolysaccharide production by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* // *Food Sci. Biotechnol.* 2019. Vol. 28, № 4. P. 1135–1145.
9. Mehta S., Jandaik S., Gupta D. Effect of cost-effective substrates on growth cycle and yield of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) from Northwestern Himalaya (India) // *Int J Med Mushrooms.* 2014. Vol. 16, № 6. P. 585–591.
10. Hsieh C., Hsu T.-H., Yang F.-C. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage // *Process Biochemistry.* 2005. Vol. 40, № 2. P. 909–916.

### **Конститутивное снижение уровня полифосфатов в клетках *S. cerevisiae* приводит к мобилизации генов, ответственных за устойчивость к окислительному и марганцевому стрессу**

<sup>1</sup>Трилисенко Л., <sup>2</sup>Пенин А., <sup>3</sup>Елисеева И., <sup>4</sup>Кулаковский И., <sup>1</sup>Валиахметов А.,  
<sup>1</sup>Звонарев А., <sup>5</sup>Остроумов В., <sup>1</sup>Кулаковская Т.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
alla@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,

<sup>3</sup>Институт белка РАН,

<sup>4</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,

<sup>5</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения

Клетки штамма *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppn1, характеризуются значительно сниженным содержанием неорганических полифосфатов. По сравнению с родительским штаммом, в клетках этого штамма наблюдается увеличение экспрессии генов, связанных с ответом на неблагоприятные условия среды, в том числе генов, кодирующих белки цитоплазматической мембраны и окислительно-восстановительные ферменты. Таким образом, сниженный уровень полифосфатов ассоциирован с преадаптационным состоянием клетки. В частности, увеличивается экспрессия гена *PMA2*, кодирующего минорную АТФазу плазматической мембраны, и *MNC1*, кодирующего белок, предположительно связывающий ионы марганца. У нокаут-мутантов по этим генам адаптация к марганцу нарушена. В результате клетки штамма-сверхпродуцента Ppn1 более устойчивы к перекисному стрессу, а также к стрессу, вызванному токсической концентрацией ионов марганца в среде. Еще одним механизмом, обеспечивающим увеличение устойчивости к марганцу, является значительное снижение экспрессии гена *PNO84*, кодирующего транспортный белок цитоплазматической мембраны – переносчик фосфата и двухвалентных катионов, в первую очередь, ионов марганца. В результате клетки штамма-сверхпродуцента Ppn1 накапливают в несколько раз меньше марганца по сравнению с родительским штаммом. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что низкий уровень полифосфатов является внутриклеточным сигналом, обеспечивающим развертывание антистрессорной программы в клетках дрожжей.

## Геномный анализ метаболизма углеводов у бактерий рода *Sphaerochaeta*

Трошина О.Ю., Щербакова В.А.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.Пушино;  
oltro676@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_163-164

Бактерии рода *Sphaerochaeta* семейства *Spirochetaceae* являются облигатным компонентом разнообразных анаэробных микробных сообществ. Их нуклеотидные последовательности обнаружены в том числе в кишечном тракте животных [1]. Таксономически описаны пять видов сферохет *S. associata* GLS2<sup>T</sup>, *S. globosa* Buddy<sup>T</sup>, *S. pleomorpha* Grapes<sup>T</sup>, *S. coccoides* SPN1<sup>T</sup> и *S. halotolerans* 4-11<sup>T</sup> [2-5]. Для всех получены геномные последовательности. Несмотря на широкое распространение сферохет их биология и метаболические свойства изучены недостаточно.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании углеводного метаболического потенциала бактерий рода *Sphaerochaeta* на основании анализа их геномов, а также геномов родственных представителей семейства *Spirochaetaceae*. Сравнительный анализ показал повышенное содержание и разнообразие генов транспорта и катаболизма углеводов. Плотность генов транспортных систем на 1 Mb геномов *S. coccoides*, *S. globosa*, *S. associata* и *S. pleomorpha* составляет 0.14, 0.16, 0.16 и 0.18 соответственно по сравнению с 0.11 в среднем для других представителей семейства *Spirochaetaceae*. Наиболее представлены гены первичных АВС-транспортных систем мелибиозы/стахиозы/раффинозы, рибозы, множественных сахаров, алдуронатов и TRAP-системы С4 дикарбоксилатов. У всех исследованных сферохет есть АВС-системы для транспорта дигалактуронатов, метилгалактозидов, рамнозы и у всех за исключением *S. pleomorpha* есть транспортная система для олигогалактуронидов. Другие типы переносчиков, такие как фосфотрансферазная система переноса сахаров и вторичные транспортёры типа MFS имеют незначительную представленность в геномах изученных бактерий.

Геномы сферохет содержат умеренный по разнообразию набор гликозид-активных ферментов. Белки разных классов гликозид-гидролаз GH2, GH3, GH4, GH13, GH31, GH43, GH57, GH105 и карбоксиэстераза CE9 наиболее представлены в геномах *Sphaerochaeta*. Также у всех присутствуют GH1, 20, 28, 36, 63, 77 и CE8. В исследованных *Sphaerochaeta* не обнаружен ген, кодирующий мурамидазу/пептидогликан-трансгликолазу семейства GH23. Анализ спектра гликозил-активных белков указывает на способность этих бактерий использовать только моно- и олигомерные углеводы, в частности галактозиды, глюкозиды, ксилоолигосахариды. Анализ CAZy ферментов сферохет указывает на способность этих бактерий к расщеплению компонентов пектина, таких как гомогалактуронан и рамногалактуронан I. В геномах всех сферохет присутствуют гены гомологичные полигалактуроназе (GH28), а также карбоксиэстеразы семейств CE8 и CE12. В геномах *S. associata*, *S. globosa* и *S. coccoides* есть гены, кодирующие вероятную ненасыщенную глюкуронил-гидролазу (хондроитин дисахарид гидролазу (GH88) и гены предполагаемых гепариназ (PL12, PL33). Наличие генов для GH88, а также генов, кодирующих белки семейств PL12, PL33, создаёт возможность использования этими бактериями гликозаминогликанов.

Геномный анализ бактерий рода *Sphaerochaeta* показал наличие у них генов для широкого спектра активных АТФ-зависимых транспортных систем (АВС-переносчики) для моно- и олигосахаридов. При этом в геномах исследованных бактерий закодирован умеренный по разнообразию набор ферментов деградации углеводов, среди которых наиболее представлены  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -глюкозидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ксилозидазы, глюкуронидазы, действующие на олигомерные субстраты. Таким образом, в многокомпонентных микробных сообществах сферохеты сотрудничают с другими микроорганизмами, первичными бродильщиками, и активно конкурируют с микрофлорой рассеяния за продукты разложения растительной и микробной биомассы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00831).*

#### Литература

1. Dewhirst, Floyd & Klein, Erin & Thompson, Emily & Blanton, Jessica & Chen, Tsute & Milella, Lisa & Buckley, Catherine & Davis, Ian & Bennett, Marie-Lousie & Marshall-Jones, Zoe. (2012) The Canine Oral Microbiome. PloS one. 7. e36067. 10.1371/journal.pone.0036067.
2. Bidzhieva SKh, Sokolova DSh, Tourova TP, Nazina TN. (2018) Bacteria of the genus *Sphaerochaeta* from low-temperature heavy oil reservoirs (Russia). Microbiology (Moscow) 87:745–753.
3. Dröge S, Frohlich J, Radek R & Helmut Konig (2006) *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a Novel Coccoid Spirochete from the Hindgut of the Termite *Neotermes castaneus*. Appl Env Microbiol 72: 392–397.
4. Ritalahti KM, Justicia-Leon SD, Cusick KD, Ramos-Hernandez N, Rubin M, Dornbush J & Löffler FE (2012) Isolation of *Sphaerochaeta* (gen. nov.), free-living, spherical spirochetes, and characterization of *Sphaerochaeta pleomorpha* (sp. nov.) and *Sphaerochaeta globosa* (sp. nov.). Int J Syst Evol Microbiol 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 doi: 10.1099/ijsem.0.000575).

## Медьсодержащие оксидазы бактерии *Streptomyces puniceus*: получение, характеристика ферментов

<sup>1</sup>Трубицин И.В., <sup>1</sup>Трубицина Л.И., <sup>1,2</sup>Лисов А.В., <sup>1,2</sup>Ларионова А.П.,  
<sup>1,2</sup>Леонтьевский А.А.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
г. Пушкино; lyubov\_yurevich@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_164-165

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино

Медьсодержащие оксидазы (МО) – ферменты из класса оксидоредуктаз, способные окислять широкий спектр органических и неорганических соединений. Повышенный интерес к МО вызван их востребованностью в различных биотехнологических процессах. В бактериальных геномах можно идентифицировать гены как двухдоменных (2д), так и трёхдоменных (3д) МО, причём в геноме одной бактерии можно идентифицировать до пяти генов МО. Большой интерес представляет получение и сравнительная характеристика МО, гены которых идентифицированы в одном бактериальном геноме. В настоящее время отсутствуют работы по исследованию различных в структурном отношении МО, полученных из одного микроорганизма, поэтому данная работа, целью которой является получение и сравнительная характеристика МО, идентифицированных в геноме бактерии *Streptomyces puniceus*, является актуальным исследованием.

В геноме бактерии *Streptomyces puniceus* NRRL В-2895 было идентифицировано четыре гена, относящихся к семейству МО. Белки WP\_030188577.1, WP\_030191459.1 и WP\_078866770.1 были классифицированы как 3д МО, белок WP\_030190946.1 – как 2д лакказы, которая ранее была получена нами и охарактеризована. Гены, кодирующие 3д МО WP\_030191459.1 и WP\_078866770.1, были амплифицированы с использованием в качестве матрицы геномной ДНК штамма *Streptomyces puniceus* ВКМ Ас-579, затем клонированы в экспрессионный вектор pQE-30 и экспрессированы в штаммах *Escherichia coli* М15 (pRep4) и *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). При экспрессии в штамме М15 (pRep4) наблюдалась высокая продукция белков, однако они не обладали ферментативной активностью. При экспрессии в штамме BL21-CodonPlus (DE3) выход белков был низким, но МО обладали ферментативной активностью. Очистку МО проводили с помощью аффинной хроматографии: на колонке HisTrap<sup>TM</sup>FF с Ni-сефарозой. Белок WP\_030191459.1 (СР3) сходил с колонки при элюции буфером с 300 мМ имидазолом, белок WP\_078866770.1 (СР4) – с 20 мМ имидазолом.

Оба фермента окисляли типовые субстраты лакказ: АБТС – при кислых значениях рН; 2,6-ДМФ – при щелочных значениях рН. Фермент СР3 окислял АБТС с максимальной скоростью при рН 4,5; 2,6-ДМФ – при рН 8,5. Фермент СР4 окислял АБТС с максимальной скоростью при рН 2,15. С увеличением рН скорость реакции уменьшалась. Максимальная скорость окисления 2,6-ДМФ ферментом СР4 наблюдалась при рН 7,5. Температурный оптимум СР3 составил 90°C, СР4 – 50°C. Исследовано влияние ингибиторов на активность ферментов. Остаточная активность СР4 в присутствии 10 мМ ЭДТА составляла 58%, в присутствии 10 мМ азида натрия – 2%. Фермент СР3 практически не ингибировался ЭДТА (фермент сохранял 96% начальной активности в присутствии 10 мМ ЭДТА), остаточная активность в присутствии 10 мМ азида натрия составляла 32%. Фермент СР4 был способен обесцвечивать трифенилметановый краситель малахитовый зелёный без добавления медиаторов. Фермент СР3 обесцвечивал малахитовый зелёный только в паре с медиатором АБТС.

Результаты: получены ранее не исследованные 3д МО СР3 и СР4 бактерии *Streptomyces puniceus* ВКМ Ас-579; исследованы некоторые физико-химические свойства

ферментов CP3 и CP4 (оптимумы pH, температурный оптимум); исследовано влияние ингибиторов на активность ферментов; показана способность CP3 и CP4 обесцвечивать краситель малахитовый зелёный.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00566.*

## **Анализ генома метаногенной археи *Methanosarcina mazei* JL01**

**Трубицын В.Э., Ошуркова В.И., Щербакова В.А.**

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
lichoradkin43@gmail.com; DOI: 10.18334/ibpm2019\_166-168

*Methanosarcina mazei* штамм JL01 (=VKM В-2370 = JCM 31898) является строго анаэробным, неподвижным метаногенным микроорганизмом. Штамм был выделен из многолетнемёрзлых отложений Колымской низменности (Россия) [1] и его клетки диаметром 1,0-1,5 мкм, собраны в типичные для данного рода агрегаты. Клеточная стенка имеет толщину 40-50 нм и соответствует грамположительному типу.

Оптимальными условиями для роста метаногенной сарцины являются температура 24-28°C, pH 6,8-7,3 и солёность 4,5-6,0 г/л. В качестве субстратов клетки штамма активнее всего используют метанол и триметиламин (время удвоения 8,77 и 10,4 ч, соответственно). Штамм также способен утилизировать ацетат, метиламин и диметиламин, очень слабо растет на газовой смеси H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (в пропорции 4:1). Сравнение последовательностей целых геномов штамма JL01 и *Methanosarcina mazei* S-6<sup>T</sup> (ANI 98,5%) показало, что данный арктический изолят относится к виду *M. mazei*. Геном депонирован в NCBI (CP029709.1).

Секвенирование целого генома было выполнено в CRG (Centre for Genomic Regulation, Барселона, Испания) на платформе Illumina HiSeq с глубиной секвенирования 30×, метод сборки генома – SOAPdenovo v. v2. Геном был собран из 323 контигов, абсолютная длина и длина с пропусками составили 4 186 733 и 4 127 022 п.н., соответственно. Содержание GC пар составило 41,6%, N50 равен 57 424 п.н., L50 включает 21 участок. При оценке генома с помощью алгоритма CheckM [9] было показано, что его целостность составляет ~99% (227 совпадений по 228 маркерам *Euryarchaeota*, погрешность ≤1%), степень контаминирования 0,65% (1 гетерогенетический маркер, погрешность ≤1%).

Геном был аннотирован с использованием веб-сервисов NCBI RefSeq [2] и DFAST [3] (рис.1). Абсолютное количество генов составляет 3 615 (3 543 CDS), из которых 3 364 белок-кодирующих последовательностей и 179 псевдогенов. В геноме присутствуют 72 последовательности РНК, включая 12 рРНК (4 гена 5S, 4 гена 16S, 4 гена 23S), 58 tRNA и 2 мяРНК. Имеется от 7 [2] до 14 [3] CRISPR регионов. Коэффициент кодирования равен 73,4% [3]. У штамма JL01 нет идентифицированных плазмид.

С помощью трёх различных веб-сервисов было показано, что геном метаносарцины предположительно содержит провирусы: PHASTER [4] (1 вероятный провирус, длина 11,5 т.п.н., 13 белков, 3 893 294-3 904 802 п.н.), Prophinder [5] (1 вероятный провирус, длина 80,12 т.п.н., 62 белка, 3 831 837-3 911 958 п.н.) и Prophage Hunter [6]. Последний идентифицировал 57 вероятных провирусов, включая 3 провируса с неоднозначной активностью (20,4, 26,9 и 15,2 т.п.н. с 21, 20 и 14 CDS соответственно), 1 неактивный кандидат в области, обнаруженной с помощью PHASTER, и 3 неактивных кандидата в начале последовательности, обнаруженной с помощью Prophinder.



4. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44: W16-W21.
5. Lima-Mendez G., Van Helden J., Toussaint A., Leplae R. 2008. Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes. *Bioinformatics.* Mar 15; 24 (6): 863–865. <https://doi:10.1093/bioinformatics/btn043>.
6. Wenchen Song, Hai-Xi Sun, Carolyn Zhang, Li Cheng, Ye Peng, Ziqing Deng, Dan Wang, Yun Wang, Ming Hu, Wenen Liu, Huanming Yang, Yue Shen, Junhua Li, Lingchong You, Minfeng Xiao. 2019. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Research.* July 2; 47 (W1): W74–W80, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz380>
7. Kanehisa M. Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research.* 28: 27–30.
8. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. 2018. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 25:1043–1055.
9. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 28: 1166-1167.

## **Выявление гетерогенности среди представителей рода *Debaryomyces* при помощи микоцинов *Wickerhamomyces anomalus***

<sup>1</sup>Фарофонова В.В., <sup>1,2</sup>Качалкин А.В.

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН, Пущино,

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

Виды рода *Debaryomyces* используются в промышленных производствах продуктов питания, некоторые представители рода известны как возбудители кожных микозов. При этом виды внутри рода и штаммы внутри видов плохо различимы по сиквенсам ITS-регионов. Кроме того, многие штаммы были отнесены к тем или иным видам на основании лишь описаний, без применения генетических методов. В связи с определённой сложностью выделения ДНК из грибов, имеет смысл разработки быстрой и дешёвой тест-системы, позволяющей сосредоточить все усилия на наиболее гетерогенных группах и их представителях.

Нами был поставлен тест культура против культуры между 14 штаммами рода *Debaryomyces* (см. таблицу) и 53 штаммами вида *Wickerhamomyces anomalus* (VKMY-60, 61, 118, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 170, 171, 174, 175, 177, 225, 1086, 1087, 1431, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2353, 2511, 2512, 2513, 3037). Штаммы предоставлены Всероссийской коллекцией микроорганизмов (ИБФМ РАН) и кафедрой биологии почв (МГУ). Для теста использовали культуры, не старше трёх суток. Клетки чувствительного штамма (*Debaryomyces*spp.) суспензировали в стерильном физрастворе (10<sup>5</sup>кл/мл) и растирали 0.05 мл суспензии по поверхности агара. Клетки микоциногенных штаммов (*W. anomalus*) наносили штрихом поверх растёртой суспензии. Результаты снимали на 2-е сутки.

Из 53 представителей вида *W. anomalus* только на 11 штаммов реакция дебариомицетов различалась (см таблицу).

При сопоставлении результатов секвенирования ITS и D1/D2 регионов с выявленными различиями в реакции на микоцины, становится понятно, что данный метод, во-первых, позволяет различать штаммы внутри вида; во-вторых, способен отделить разные виды

друг от друга, несмотря на их крайнее сходство с генетической точки зрения; и, в третьих, является хорошим дополнением к генетическим методам систематики.

Табл.1. Различия в реакции штаммов рода *Debaryomyces* (столбик, штаммы предоставлены VKM, если не обозначено иное) на микоцины вида *W. anomalus* (строка). «+» – четко видимая зона отсутствия роста вокруг штриха, «сл» – проявление антагонизма без образования зоны подавления роста, «-» – отсутствие реакции.

	60	61	118	146	157	158	225	1908	1909	1910	2353
<b>9</b>	сл	-	сл	-	сл	+	сл	сл	сл	+	сл
<b>106</b>	сл	-	-	-	сл	сл	-	-	сл	сл	-
<b>113</b>	-	-	-	сл	+	+	-	сл	сл	сл	-
<b>1054</b>	сл	-	сл	-	+	+	-	+	+	+	-
<b>109</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>116</b>	сл	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>102</b>	-	-	-	-	+	+	сл	+	+	+	-
<b>КБП 6444</b>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<b>2570</b>	-	-	-	-	+	+	сл	+	+	+	-
<b>2571</b>	-	-	-	-	-	-	-	сл	-	-	-
<b>90</b>	сл	-	-	-	+	+	сл	+	+	+	сл
<b>КБП 5166</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>КБП 6047</b>	-	-	-	-	+	+	-	+	сл	+	-

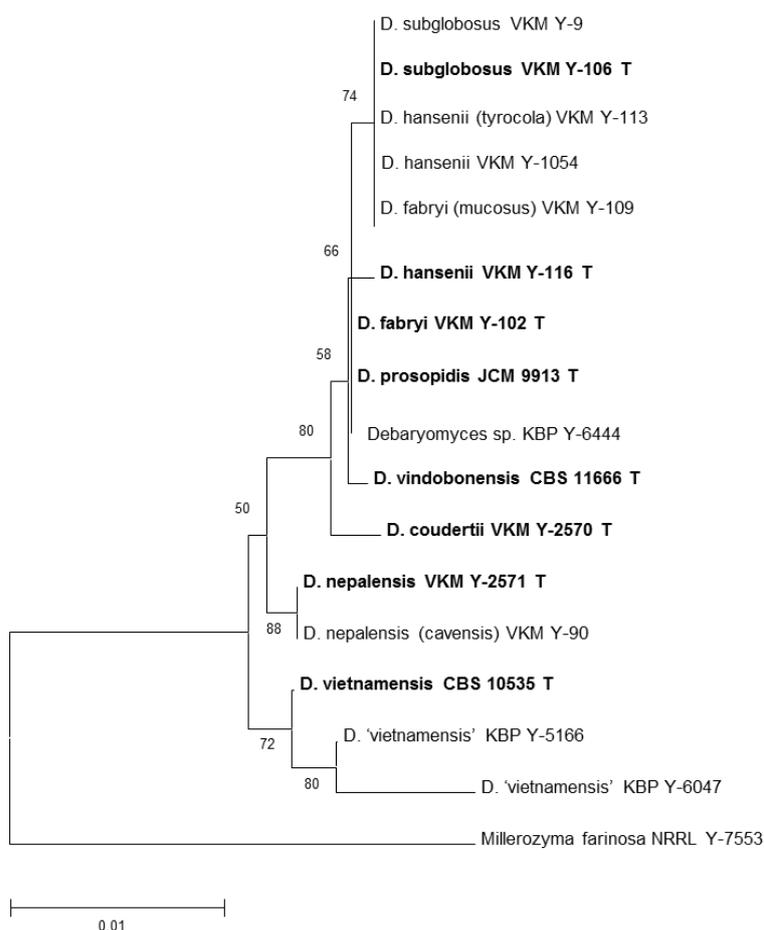


Рис. 1. Филогенетическое положение исследованных штаммов рода *Debaryomyces* по данным нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов LSU рДНК, полученное методом максимального правдоподобия (ML).

# Получение и характеристика нокаут-мутантов *Methylorubrum extorquens* DM4 по генам предполагаемых L,D-транспептидаз METDI0480 и METDI3291

Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; yulhenbisti@mail.ru,  
DOI: 10.18334/ibpm2019\_170-172

Ранее в протеоме клеток метилотрофного деструктора *Methylorubrum extorquens* DM4, выращенных на дихлорметане (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ДХМ), было выявлено повышенное накопление белков, кодируемых генами METDI0480 и METDI3291 (Muller et al., 2011). Предположительно, указанные гены кодируют L,D-транспептидазы, участвующие в создании поперечных сшивок в пептидогликане, упрочняющих конструкцию клеточной стенки и повышающих устойчивость к воздействию растворителей. Поэтому была поставлена задача изучить роль соответствующих белков в адаптации к росту на ДХМ. Гены METDI0480 и METDI3291 расположены на хромосоме и имеют сравнительно небольшие размеры (1095 и 672 п.н., соответственно). Для получения нокаут-мутанта фрагмент гена METDI0480 (795 п.н.) был амплифицирован методом ПЦР из геномной ДНК *M. extorquens* DM4 с помощью пары праймеров 0480for (5'-atcctctagactactgtccaggaactc-3') и 0480rev (5'-ttaaagcttgccgactcaaacgctt-3'), содержащих сайты рестрикции *Xba*I и *Hind*III (подчеркнуты), и клонирован в вектор pK18mob (Schäfer et al., 1994) по этим же сайтам. В полученную плазмиду p0480 по сайту *Sal*I была вставлена кассета устойчивости к гентамицину из вектора p34S-Gm (Dennis, Zylstra, 1998). Для инактивации гена второй предполагаемой транспептидазы в вектор pK18mob был клонирован концевой участок гена METDI3291 с захватом фланкирующей последовательности ДНК (823 п.н.), амплифицированный с помощью праймеров 3291for (5'-ataggtaccgtctacgaccsctatgcca-3') и 3291rev (5'-gttaaagcttaattgcgatcggtgcaatc-3'), содержащих сайты рестрикции *Acc*65I и *Hind*III (подчеркнуты). В полученную плазмиду p3291 по сайту *Bam*HI была вставлена кассета устойчивости к гентамицину (865 п.н.) из вектора p34S-Gm. Итоговые конструкции p0480-Gm и p3291-Gm содержали мутантный ген METDI0480 или METDI3291 со вставкой маркерного гена антибиотикоустойчивости, области гомологии для рекомбинации составили 394/388 п.н. и 400/398 п.н., соответственно. Мобилизацию плазмид p0480-Gm и p3291-Gm в *M. extorquens* DM4 проводили путем двуродительского скрещивания со штаммом *E. coli* S17-1. Из полученных трансконъюгантов отбирали только двойные рекомбинанты, устойчивые к гентамицину и чувствительные к канамицину.

Установлено, что полученные нокаут-мутанты ΔMETDI0480 и ΔMETDI3291 сохранили способность к росту на сукцинате и C<sub>1</sub>-соединениях, однако скорость роста на ДХМ была снижена на 10 и 17%, соответственно, как у клеток, предварительно выращенных на метаноле, так и у преадаптированных к ДХМ (Рис. 1). При сравнительной оценке устойчивости мутантов и исходного штамма DM4wt к воздействию различных типов стрессов обнаружено, что мутанты, выращенные до стационарной фазы роста, более чувствительны к повышенной концентрации NaCl, этанолу и тепловому шоку (55°C, 5 мин) по сравнению с исходным штаммом. В стационарной фазе роста на ДХМ или метаноле мутант ΔMETDI3291 также оказался более чувствителен к воздействию детергента ДСН, а клетки штамма ΔMETDI0480 были существенно менее устойчивы к высушиванию, чем DM4wt. В то же время мутанты практически не отличались от

исходного штамма по устойчивости к  $H_2O_2$ , метилглиоксалу и формальдегиду. Поскольку предполагаемые транспептидазы METDI0480 и METDI3291 содержат домен YkuD, определяющий устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, диско-диффузионным методом была протестирована чувствительность соответствующих мутантов к ампициллину. Штамм  $\Delta$ METDI3291 оказался на 26% более чувствителен к этому антибиотику, чем DM4wt.

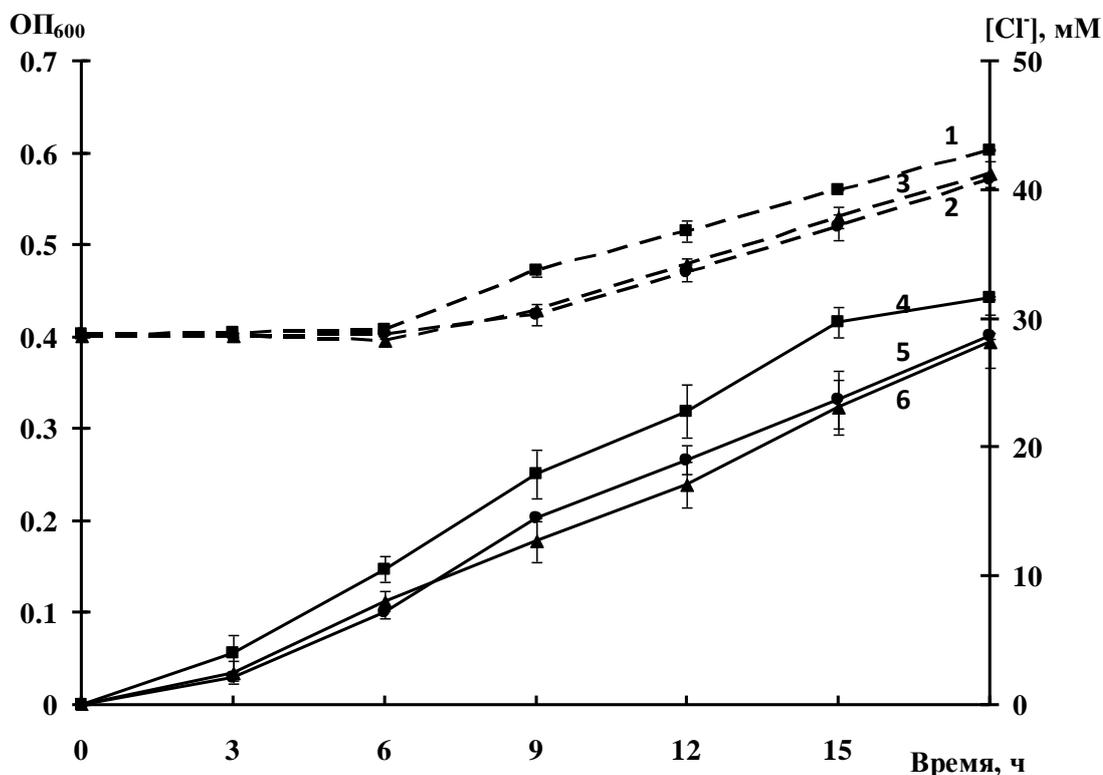


Рис. 1. Динамика роста на ДХМ *M. extorquens* DM4wt (1,4) и мутантов  $\Delta$ METDI0480 (2,5) и  $\Delta$ METDI3291 (3,6), определенная по показателям оптической плотности суспензии клеток (1-3) и концентрации ионов хлора в среде (4-6), образующихся при разложении ДХМ. Клетки преадаптированы к росту на ДХМ в течение трех пассажей.

Таким образом, инактивация генов предполагаемых L,D-транспептидаз METDI0480 и METDI3291 привела к снижению устойчивости *M. extorquens* DM4 к ряду стрессовых факторов (повышенная соленость, воздействие детергентов, высушивание), что обусловило снижение скорости роста на ДХМ. Относительно небольшой фенотипический эффект мутаций  $\Delta$ METDI0480 и  $\Delta$ METDI3291, вероятно, объясняется компенсаторной экспрессией генов других транспептидаз, присутствующих в геноме *M. extorquens* DM4.

В дальнейшем для оценки количества 3-3 поперечных сшивок, образуемых L,D-транспептидазами, планируются исследования структуры пептидогликана исходного и мутантных штаммов, включающие получение препарата муреина, обработку N-ацетилмурамидазой, мечение муропептидов флуоресцентным красителем ANTS с последующим разделением методом FACE (Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) (Li et al., 2004).

## Литература

1. Dennis J.J., Zylstra G.J. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 2710–2715.
2. Li S.-Y., Hölte J.-V., Young K.D. Comparison of high-performance liquid chromatography and fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis methods for analyzing peptidoglycan composition of *Escherichia coli* // Anal Biochem. 2004. V. 326. № 1. P. 1-12.
3. Muller E.E., Hourcade E., Louhichi-Jelail Y., Hammann P., Vuilleumier S., Bringel F. Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4 // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 9. P. 2518-2535.
5. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69-73.

## Анализ взаимодействия транскрипционных факторов NahR – like типа с регуляторными областями

Фролова А. А., Позднякова – Филатова И. Ю.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
ali.frolowa@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_172-173

Некоторые представители рода *Pseudomonas* способны метаболизировать нафталин, простейший представитель ПАУ, через образование промежуточного салицилат - иона до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Рост этих микроорганизмов в присутствии салицилата приводит к индукции двух оперонов, кодирующих ферменты деградации нафталина и салицилата. Активация транскрипции происходит в присутствии транскрипционного фактора NahR, принадлежащего к LysR – семейству, в комплексе с молекулой индуктором.

Исследуемые в данной работе транскрипционные регуляторы NahR из штаммов *P.putida* G7 и AK5 гомологичны друг другу на 90%. В литературе NahR (G7) называют архетипичным и приводят как модельный регулятор, т.к. это первый охарактеризованный транскрипционный регулятор генов деструкции нафталина и салицилата. Гомология генов деструкции нафталина штамма *P.putida* AK5 достигает 99% с генами штаммов *P.putida* NCIB 9816-4 (pDTG1) и *P.putida* ND6 (pND6-1).

Были получены fusion – конструкции *nahR(G7)::gfp* и *nahR(AK5)::gfp* с регуляторными областями генов деструкции салицилата из штаммов *P.putida* G7 и AK5, соответственно. Градуировочные зависимости интенсивности флуоресценции GFP полученных систем от концентрации салицилата натрия имеют сигмоидальный вид и описываются уравнением Хилла. Физический смысл коэффициентов уравнения позволяет соотнести различия параметров белковых взаимодействий аффинной природы с заменами в последовательности белков или регуляторных областей.

Динамический диапазон определяется как максимальное увеличение экспрессии относительного базального уровня и показывает сродство транскрипционного фактора к ДНК. Динамический диапазон, а следовательно, и стабильность комплекса ДНК-белок выше в системе *nahR(G7)::gfp*. Проанализировав аминокислотные последовательности ДНК – связывающих доменов, исследуемых транскрипционных регуляторов, были

обнаружены замены, соответствующие нерегулярным участкам, которые не влияют на связывание белка с ДНК.

Выравнивание регуляторных областей генов деструкции нафталина и салицилата, показало наличие высокомолекулярного участка с вырожденным палиндромом. Из литературы известно, что сайты связывания транскрипционных факторов LysR – семейства почти неизменно содержат мотив TTCА – N<sub>6</sub> – TGAT. В регуляторной области генов деструкции салицилата штамма *P.putida* G7 была обнаружена абсолютно идентичная последовательность, у штамма *P.putida* AK5 выявлена замена G на A. Помимо типичного консенсуса TTCА – N<sub>6</sub> – TGAT у штамма *P.putida* G7 был обнаружен вырожденный палиндром TTCAT – N<sub>4</sub> – ATGAT, содержащий более короткую вариативную часть, для штамма *P.putida* AK5 подобного не наблюдается.

Наличие в регуляторной области генов деструкции салицилата штамма *P.putida* G7 консенсусной для LysR – семейства последовательности палиндрома может быть причиной более высокой стабильности комплекса транскрипционного фактора с ДНК. Дальнейшее подтверждение этой гипотезы требует характеристики *in vitro* взаимодействия белка с регуляторной областью.

## **Влияние золя гидроксида марганца (II) на кинетику роста *Y. enterocolitica* и *P. aeruginosa***

<sup>2</sup>Черепанов Д.В., <sup>2</sup>Леонова Л. В., <sup>1,2</sup>Леонов В. В.

<sup>1</sup>БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», г. Ханты-Мансийск,  
leonovvadim@yandex.ru

<sup>2</sup>ФГБУ ВО «Югорский государственный университет», г. Ханты-Мансийск

Наличие в системе водоснабжения соединений железа и марганца способствует развитию железо- и марганцеоксиляющих бактерий. Железо- и марганцеоксиляющие бактерии представляют гетерогенную группу микроорганизмов способных окислять соединения Fe(II) до Fe(III), Mn(II) до Mn(IV). Долгое время присутствие железо- и марганцеоксиляющих бактерий в системе водоснабжения игнорировалось, так как данные бактерии не являются патогенными. Однако, постоянное повышение санитарно-химических требований к качеству питьевой воды привело к появлению интереса к этим группам микроорганизмов [1, 2].

Окисление железа и марганца микроорганизмами может выполнять различные физиологические функции: участие в энергетическом метаболизме, где Fe(II) Mn(II) выполняет роль донора электронов; функции не связанные с получением энергии, например, образование защитной оболочки, в виде гидроксида железа или марганца, от перекисных соединений и проникновения дезинфицирующих средств. Экспериментально подтверждено, что «хлор» и «хлорамин» не способны проникать в биопленки железобактерий [2]. Данная особенность, а также наличие органических веществ в составе биообрастаний, предположительно могут способствовать выживанию патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в системе водоснабжения.

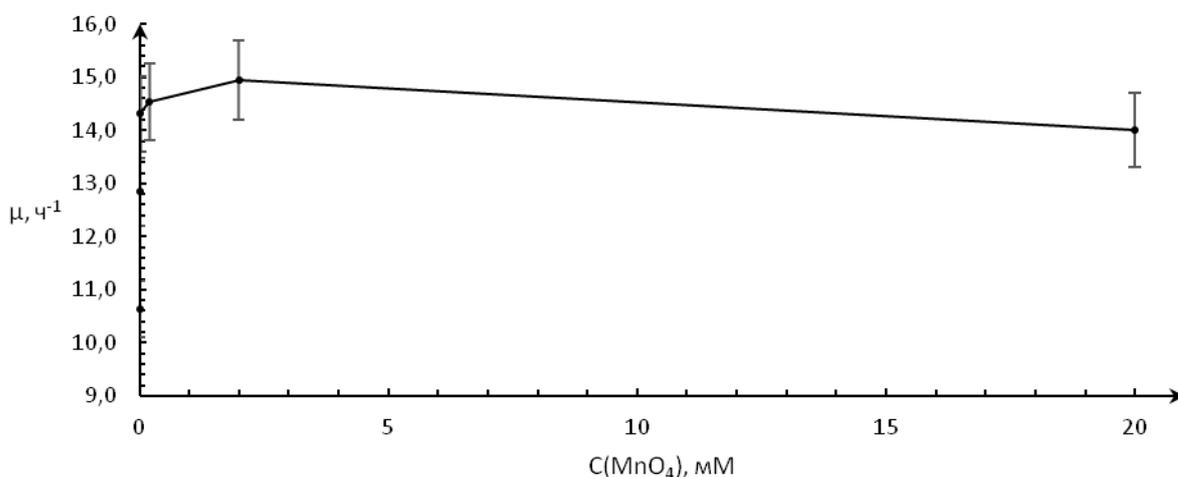
Цель работы: изучить влияние золя гидроксида марганца на кинетику роста *Yersinia enterocolitica* и *Pseudomonas aeruginosa*.

В качестве объекта исследования использовали актуальные в инфекционной патологии человека возбудители *Y. enterocolitica* 610, *P. aeruginosa* 24853. Все штаммы были выделены от больных Окружной клинической больницы. Культуры выращивались в пластиковых пробирках на LB среде (триптон – 10,0 г/л, дрожжевой экстракт – 5,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, pH 7,0) с добавлением золя гидроксида марганца(II) в концентрациях:

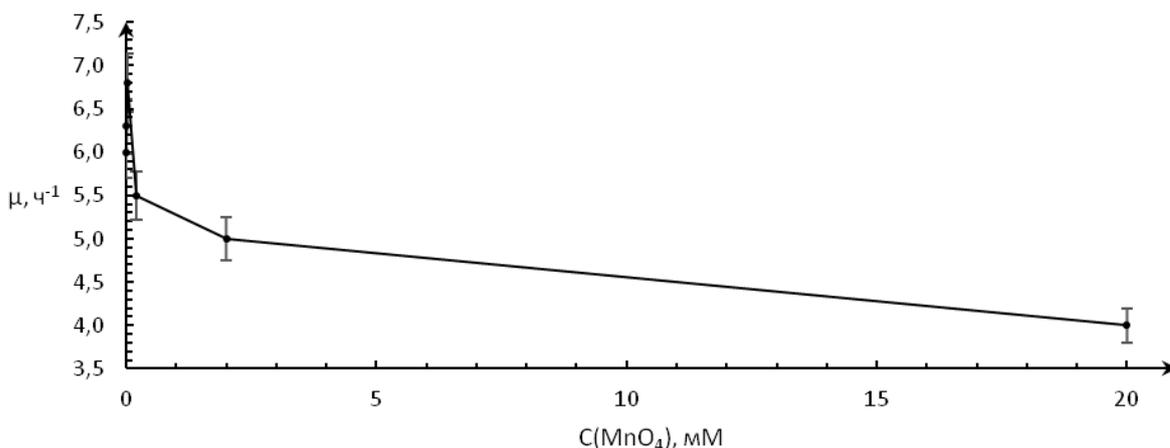
0,002; 0,02; 0,2; 2,0; 20,0 мМ. В качестве контроля использовались культуры, выращенные на LB-среде без добавления золя. Рост микроорганизмов оценивали методом серийных разведений. Рассчитывали удельные скорости роста ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) микроорганизмов как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кривой роста.

Результаты исследования представлены в виде графиков зависимости изменения удельной скорости роста от количества гидрозоль диоксида марганца в питательной LB-среде. Как видно из представленных данных, все микроорганизмы способны выживать в присутствии золя гидроксида марганца(II). Для *Y. enterocolitica* было выявлено, что все использованные для эксперимента концентрации золя приводили к ингибированию ростовой активности. Для *P. aeruginosa* обнаружено, стимулирование ростовой активности в диапазоне концентраций от 0,02 до 20 мМ в 1,3 раза по сравнению с контролем. Максимальная концентрация золя гидроксида марганца 20 мМ приводила к уменьшению ростовой активности в 1,5 раза по сравнению с контролем.

#### *P. aeruginosa*



#### *Y. enterocolitica*



Таким образом, в ходе эксперимента была изучена кинетика роста *Y. enterocolitica* и *P. aeruginosa*. Для *Y. enterocolitica* показано ингибирование, а для *P. aeruginosa* стимулирование ростовой активности в присутствии высоких концентраций золя гидроксида марганца. Полученные результаты позволяют предполагать, что

*Y. enterocolitica* и *P. aeruginosa* способны выживать, а *P. aeruginosa* и размножаться, в средах с высокими концентрациями золя гидроксида марганца(II).

## Литература

1. Hedrich S., Schlomann M., Johnson D. B. The Iron-Oxidizing Proteobacteria. // Microbiology. 2011. V. 157 P. 1551-1564.
2. Maruf M., Moniruzzaman K., Martin T. Review of Iron Bacteria in Water Distribution and their Identification in a Simulated Cast Iron Water Distribution System. // UAP Journal of Civil and Environmental Engineering. 2006. V. 2(1). P. 13–19.

## Новая диоксигеназа грамположительных бактерий, расщепляющая гентизат

<sup>1</sup>Черных А.М., <sup>2</sup>Субботина Н.М., <sup>1</sup>Шебанова А.Д., <sup>1</sup>Моисеева О.В., <sup>1</sup>Коломыцева М.П.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН; mkolomytseva@rambler.ru

Гентизат (гентизиновая кислота, 2,5-дигидроксибензойная кислота) – ключевой интермедиат периферийного метаболизма широкого спектра ароматических ксенобиотиков: полиароматических углеводов (ПАУ); ацетилсалициловой, салициловой и антралиновой кислот; бензойной кислоты и ее гидрокси-, метокси, хлор-и amino-производных; толуола; флавононов и ксиленолов (диметилфенолов) (Рисунок 1).

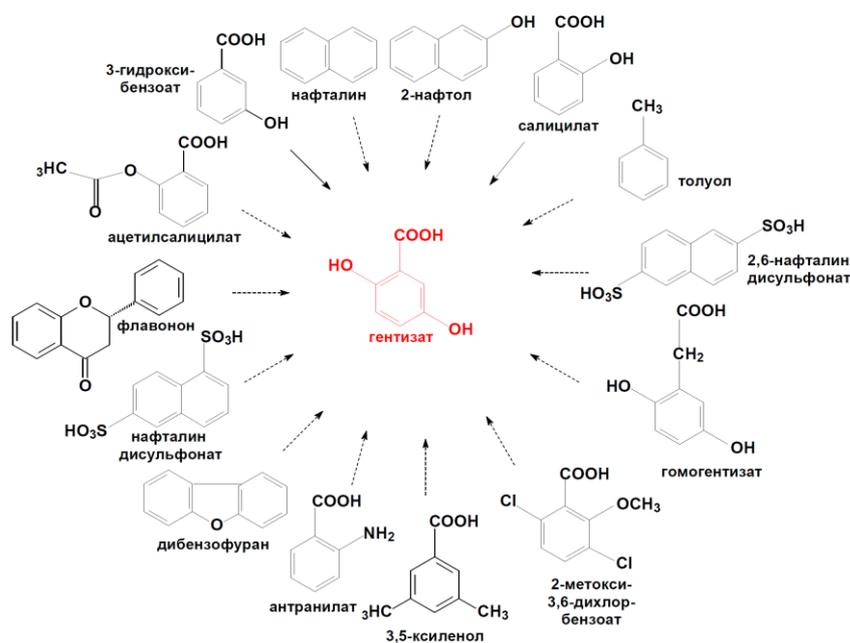


Рис. 1. Пути микробного разложения ароматических ксенобиотиков, осуществляемые через образование ключевого интермедиата расщепления ароматического кольца – гентизат.

Последующее расщепление ароматического кольца гентизата микроорганизмами, как правило, осуществляется посредством уникальной гентизат 1,2-диоксигеназы, схожей по структурным свойствам с экстрадиольными диоксигеназами, но катализирующей

разрыв ароматической связи между двумя смежными карбокси- и гидроксизаместителями в ароматическом кольце по аналогии с интрадиольными диоксигеназами (Crawford et al., 1975; Harpel and Lipscomb, 1990; Suemori et al., 1993; Feng et al., 1999; Ferraroni et al., 2012). На сегодняшний день разрешена структура всего трех гентизат 1,2-диоксигеназ и только у грамотрицательных бактерий (RCSB PDB: 2D40; 3BU7; 2PHD).

Ранее нами была показана способность грамположительной бактерии *Rhodococcus opacus* 1CP утилизировать 3-гидроксибензоат в качестве единственного источника углерода и энергии (Subbotina et al., 2012).

В настоящей работе была выделена и охарактеризована электрофоретически гомогенная гентизат 1,2-диоксигеназа из клеток грамположительной бактерии *R. opacus* 1CP, выращенной с использованием 3-гидроксибензоата в качестве ростового субстрата. Из геномной ДНК *R. opacus* 1CP выделен, идентифицирован и экспрессирован ген, кодирующий гентизат 1,2-диоксигеназу, получена ее аминокислотная последовательность. С помощью гомологического моделирования построена трехмерная модель молекулы гентизат 1,2-диоксигеназы, проведен сравнительный структурный анализ полученной модели.

### Литература

1. Subbotina N.M., Kolomytseva M.P., Golovleva L.A. 3-hydroxybenzoate and 2,5-dihydroxybenzoate metabolism in *Rhodococcus opacus* 1CP strain. *Mikrobiologiya* (Russian), 2012, V. 81(3), pp. 325-331. PMID:22880393
2. Crawford R.L., Hutton S.W., Chapman P.J. Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis* // *J. Bacteriol.* – 1975. – V. 121, № 1. – P. 794-799.
3. Harpel M.R., Lipscomb J.D. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans* // *J. of Biol. Chem.* – 1990. – V. 265, № 11. – P. 6301-6311.
4. Suemori A., Kurane R., Tomizuka N. Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus erithropolis* S-1 // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1993. – V. 57, № 10. – P. 1781-1783.
6. Feng Y., Khoo H. E., Poh C. L. Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – V. 65, № 3– P. 946-950.
7. Ferraroni M., Matera I., Steimer L., Bürger S., Scozzafava A., Stolz A., Briganti F. Crystal structures of salicylate 1,2-dioxygenase-substrates adducts: A step towards the comprehension of the structural basis for substrate selection in class III ring cleaving dioxygenases. *Journal of Structural Biology*, 2012, Vol. 177, pp. 431–438.

### Особенности деградации малахитового зелёного оксидазами гриба *Thielavia ovispora*

**Шебанова А.Д., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Баскунов Б.П., Черных А.М., Коломыцева М.П.**

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
mkolomytseva@rambler.ru, anneteshebanova@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_178-180

Малахитовый зеленый (МЗ) – краситель трифенилметанового ряда, который прежде всего производят для нужд промышленности. Загрязнение воды и почвы данным

соединением происходит в результате сброса в акваторию недоочищенных сточных вод текстильных предприятий (где его применяют для окраски шелка, кожи и бумаги), рыбовладельческих хозяйств (его активно применяется в аквариумистике и аквакультуре, из-за фунгицидных и антибактериальных свойств) и предприятий по производству красителей и др. (Robinson, 2001).

В странах Евросоюза и США данный МЗ запрещен к применению в рыбных хозяйствах, однако благодаря его дешевизне и широкому спектру действия, на территории многих стран краситель используется нелегально. Попадая в водную среду МЗ может быть легко адсорбирован твердыми поверхностями, органами и тканями живых организмов (Zhou, 2018). Накопление МЗ задерживает рост, размножение и развитие организмов и может оказывать мутагенное и канцерогенное воздействие. (Li, 2017). Запреты на использование МЗ в аквакультуре обусловлены опасностью для здоровья человека от употребления в пищу содержащей его рыбы. (Zhang, 2018). Физико-химические методы деградации МЗ (озонирование, окислительные и фотохимические процессы, ионный обмен и электрохимическое разрушение) обычно сопряжены с высокими эксплуатационными затратами и загрязнением окружающей среды. В связи с этим для минимизации экологических рисков промышленного использования МЗ в последние годы активно ведется поиск и разработка новых методов биодеструкции данного соединения, востребованных в биоремедиации сточных вод и утилизации промышленных отходов.

Одними из наиболее известных промышленно ценных ферментов, окисляющих широкий спектр ароматических субстратов без дополнительных медиаторов и кофакторов являются лакказы («голубые» оксидазы), находящие активное применение в ряде современных биотехнологий, число которых с каждым годом неуклонно растет (Baldrian, 2006; Margot, 2013). Будучи внеклеточными ферментами грибные лакказы более устойчивы к внешним воздействиям окружающей среды и стабильны, а также не требуют в ходе катализа дополнительных кофакторов и энергозатрат (с чем связаны минимальные затраты при деградации красителя). Использование лакказ в биотехнологиях сопряжено также со снижением степени загрязнения окружающей среды из-за отсутствия токсичных соединений. Однако, далеко не все известные лакказы способны разлагать промышленные красители без использования дополнительных медиаторов в среде.

В настоящей работе показана способность оксидаз культуральной жидкости гриба *Thielavia ovispora*, полученной в ходе ранее подобранных оптимальных условий погруженного культивирования мицелия в жидкой минеральной среде с использованием природных источников углерода и энергии, активно трансформировать МЗ. Разработана и усовершенствована методика количественного определения МЗ и его токсичной лейкоформы в реакционной смеси, которая включает не только спектрофотометрические исследования, как в большинстве опубликованных статей и патентах, но и оценку деградации красителя культуральной жидкостью гриба *T. ovispora* с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. С помощью тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии выделены и идентифицированы интермедиаты трансформации МЗ.

Разработана оптимальная схема очистки оксидаз гриба, полученной в ходе погруженного культивирования мицелия в жидкой минеральной среде с использованием природных источников углерода и энергии посредством анионообменной и гидрофобной хроматографий, а также гель- и ультрафильтраций. В результате было выделено два гомогенных ферментных препарата и исследованы кинетические и физико-химические свойства полученных голубых оксидаз. Подтверждена способность одной из выделенных оксидаз обесцвечивать МЗ и широкий спектр других промышленных красителей без использования дополнительных медиаторов и кофакторов.

## Литература

1. Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties: A review. FEMS Microbiology. (2006) 30: 215–242.
2. Li L, Peng A.H, Lin Z.Z., Zhong H.P., Chen X.M., Huang Z.Y. Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film. Food Chem (2017) 229: 403–408.
3. Margot J., Bennati-Granier C., Maillard J., Blázquez P., Barry D.A., Holliger C. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. AMB Express. (2013) Oct 24; 3(1): 63.
4. P. Zhang, D. Hou, D. O'Connor, X. Li, S. Pehkonen, R.S. Varma, X. Wang, Green and size-specific synthesis of stable Fe–Cu oxides as earth-abundant adsorbents for malachite green removal, ACS Sustain. Chem. Eng. (2018) 6: 9229-9236.
5. Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology (2001) 77: 247–255.
6. Zhou X., Zhang J., Pan Z., Li D. Review of methods for the detection and determination of malachite green and leuco-malachite green in aquaculture. Crit Rev Anal Chem (2018)14: 1–20.

### **Возможность усиления фунгицидного эффекта Фоликура® 250, КЭ против некоторых грибов рода *Fusarium* с помощью одного из вторичных метаболитов *Penicillium citrinum***

*Щербакова Л.А., Карташов М.И., Арсланова Л.Р., Джавахия В.Г.*

Всероссийский НИИ фитопатологии, Большие Вязёмы; larisavniif@yahoo.com

Микроорганизмы продуцируют множество биологически активных соединений, исследование которых открывает возможности для создания новых биотехнологий. Поскольку эти биологически активные соединения не являются ксенобиотиками, и не создают проблемы загрязнения окружающей среды трудно разлагаемыми токсичными остатками, многие технологии, основанные на их использовании, находят практическое применение в растениеводстве и других областях сельского хозяйства. Биотехнологические разработки для защиты растений включают использование вторичных микробных метаболитов в качестве действующих веществ при создании биофунгицидов и других биопестицидов [1-2]. Кроме того, целый ряд веществ, которые синтезируют микроорганизмы, способны индуцировать устойчивость сельскохозяйственных культур к вредителям и возбудителям болезней, активируя природные защитные механизмы растений [1, 3, 4]. На основе некоторых индукторов устойчивости уже созданы эффективно действующие коммерческие препараты [5]. Еще одним перспективным и новым направлением в сфере защиты растений, связанным с применением микробных метаболитов является их использование в качестве сенсibilизаторов, повышающих чувствительность фитопатогенных грибов к сельскохозяйственным фунгицидам. Подобный подход позволяет значительно снижать дозировки последних, сохраняя или даже усиливая фунгицидный эффект. Вещества с сенсibilизирующей активностью обнаружены как среди вторичных метаболитов микроорганизмов, не обладающих фунгитоксичностью, так и среди метаболитов, токсичность которых для фитопатогенных грибов значительно ниже, чем у фунгицидов [6]. Особый интерес вызывают микробные метаболиты, способные повышать чувствительность к фунгицидным препаратам у фузариевых грибов, поражающих

пшеницу и другие экономически важные культуры, а также продуцирующих опасные для человека и животных микотоксины. Фунгициды из группы триазолов широко используются для борьбы с фитопатогенными фузариями, но не всегда оказываются достаточно эффективными, особенно против их резистентных форм.

Полученные нами результаты демонстрируют принципиальную возможность применения 6-деметилмевинолина (6-ДММ), одного из вторичных метаболитов *P. citrinum*, для многократного усиления эффективности действия триазолового фунгицида Фоликур® 250, КЭ (д.в. тебуконазол) против трех видов из патоконплекса возбудителей корневой гнили злаковых и фузариоза колоса. Тестирование рост-ингибирующего эффекта 6-ДММ с расчетом его ЭД<sub>50</sub> для каждого фитопатогена показало, что в среднем фунигитоксичность данного метаболита была ниже, чем у тебуконазола в 45, 50 и 80 раз для *F. culmorum*, *F. avenaceum* и *F. graminearum* соответственно. Использование 6-ДММ в нефунгитоксичных или слаботоксичных концентрациях совместно с Фоликуром® значительно повышало чувствительность указанных фитопатогенных грибов к этому фунгициду. В последующих исследованиях были выявлены сочетания долевых ингибирующих концентраций (FIC) фунгицида с 6-ДММ, при которых полное подавление роста патогенов в присутствии данного сенсibilизатора достигалось даже в том случае, если FIC фунгицида была в десятки и сотни раз ниже его минимальной концентрации, дающей 90-100% ингибирующий эффект (MIC) при индивидуальном применении (Таблица). В экспериментах с *F. culmorum*, и *F. graminearum* значения индексов долевых ингибирующих концентраций (FICI), рассчитанные для определения характера взаимодействия в комбинациях Фоликура® с 6-ДММ, были достоверно ниже 0.50, что свидетельствовало о синергизме компонентов [7], в то время как их взаимодействие при применении против *F. avenaceum* носило аддитивный характер (FICI = 0.54). Было установлено, что контакт с 6-ДММ не стимулирует у *F. culmorum* продукцию микотоксина дезоксиниваленола (ДОНа). Судя по результатам ВЭЖХ-анализа культуральной жидкости двух токсигенных штаммов гриба, выращенных на среде с 6-ДММ, секреция ДОНа была в несколько раз ниже, чем в контроле (среда без 6-ДММ). Следовательно, перспектива практического применения данного сенсibilизатора совместно с триазоловыми фунгицидами для усиления эффективности их антипатогенного действия в этом отношении представляется безопасной.

Усиление фунгицидного эффекта Фоликура® 250, КЭ  
в отношении трех видов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*  
при использовании данного фунгицида в комбинации с 6-деметилмевинолином

Контролируемые параметры	Фоликур®				
	индивидуально		+ сенсibilизатор		
	MIC*		FIC*		
	<i>F. culmorum</i>				
Концентрация фунгицида, мкг/мл	32.0	64.0	0.1	0.2	0.4
Ингибирование роста колоний, %	99.0	100.0	99.6	100.0	100.0
	<i>F. graminearum</i>				
Концентрация фунгицида, мкг/мл	64.0	128.0	0.1	0.2	0.4
Ингибирование роста колоний, %	97.8	100.0	93.9	100.0	100.0
	<i>F. avenaceum</i>				
Концентрация фунгицида, мкг/мл	64.0	128.0	0.2	0.8	1.6
Ингибирование роста колоний, %	93.5	100.0	85.9	90.0	100.0

\* MIC - minimum inhibitory concentration; FIC - fractional inhibitory concentration – минимальные концентрации тестируемых соединений, при которых в случае их отдельного (MIC) или совместного использования (FIC) достигается полное ингибирование роста патогена.

## Литература

1. Shcherbakova L.A. Some natural proteinaceous and polyketide compounds in plant protection and their potential in green consumerization. In: Natural Products in Plant Pest Management, 2011: 109-133.
2. Klaić R., Foletto E., Prá V. et al. Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments. In: Fungal Biomolecules, 2015: 183-199.
3. Wiesel L., Newton A. C., Elliott I. et al. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 1-13.
4. Щербакова Л.А., Джавахия В.Г. Микробные белки и пептиды, представляющие интерес для разработки экологически безопасных технологий защиты растений от фитопатогенов. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2013. 15: 1705-1709.
5. Dewen Q., Yijie D., Yi Z., Shupeng L., Fachao S. Plant immunity inducer development and application. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2017, 30: 355-360.
6. Campbell B., Chan K., Kim J.H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 1-79.
7. Canton E., Peman J., Gobernado M., Viudes A., Espinel I.A. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and Etest methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49: 1593–1596.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-16-00084).*

## **Сравнительный геномный анализ коллекционных штаммов хересных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***

<sup>1</sup>Эльдаров М.А., <sup>1</sup>Марданов А.В., <sup>1</sup>Белецкий А.В., <sup>1</sup>Думина М.В., <sup>1</sup>Авданина Д.А.,  
<sup>2</sup>Танащук Т.Н., <sup>2</sup>Кишковская С.А., <sup>1</sup>Равин Н.В.

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва; eldarov@biengi.ac.ru

<sup>2</sup>Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, г. Ялта

Хересные дрожжи представляют уникальную группу винодельческой микрофлоры и на протяжении столетий используются для получения биологически выдержанных вин. Физиологические и биохимические характеристики хересных и винных штаммов резко отличаются [1]. Для выявления природы молекулярных различий, лежащих в основе фенотипического разнообразия штаммов дрожжей, сопоставления молекулярно-генетических данных с определенными производственными показателями, нами предпринято комплексное исследование микробиологических и генетических и геномных характеристик штаммов хересных дрожжей из коллекции ННИИВиВ «Магарач». Показано, что в условиях длительного хранения штаммы сохранили свои основные

морфологические, культуральные, биохимические свойства, установлены корреляции между определенными генетическими профилями и винодельческими параметрами штаммов [2]. Методами сравнительной геномики и генотипирования идентифицированы специфические для хересных штаммов молекулярные маркеры, позволяющие проводить направленный поиск перспективных для виноделия природных и коллекционных изолятов.

С использованием платформ PacBio и Illumina расшифрованы последовательности ядерных и митохондриальных геномов трех штаммов хересных дрожжей [3,4], охарактеризована генетическая вариабельность хересных штаммов, потенциально связанная с адаптацией этих дрожжей к специфическим условиям виноделия. Выявлены многочисленные SNP в сотнях локусах, связанных с процессами метаболизма углеводов, гомеостаза ионов, ответа на осмотический стресс, метаболизма липидов, биогенеза клеточной стенки, репарации и проч. [3]. Выявлены также различные типы хромосомных перестроек, события потери и приобретения генов, вариации в хромосомных наборах и копийности отдельных локусов.

Сравнительный анализ митохондриальных геномов винных и хересных штаммов дрожжей показал, что мтДНК хересных штаммов отличаются высокой консервативностью нуклеотидных последовательностей и структуры. Число дестабилизирующих элементов мтДНК – GC-кластеров, коротких повторов, активных *ori*-участков у хересных штаммов в целом ниже, чем у винных [4]. Консервативность мтДНК хересных штаммов может определяться как эффектами “бутылочного горлышка” в ходе эволюции, так и механизмами, направленными на поддержание генетической стабильности. В целом полученные данные не подтверждают гипотезу о повышенной генетической изменчивости митохондриальных геномов хересных штаммов дрожжей.

Проведен сравнительный анализ полиморфизма генов гомеостаза железа и чувствительности к железу у винных и хересных штаммов. [5]. Показано, что хересные штаммы дрожжей более чувствительны к повышенной концентрации железа в среде по сравнению с винными штаммами, но лучше аккумулируют железо при росте на железodefицитных средах. Эти признаки коррелирует с наличием мутации Q648X в транскрипционном факторе Aft1p, приводящей к образованию его «укороченной» формы и с хромосомной перестройкой, приводящей к делеции FRE-FIT кластера, содержащего гены железоредуктаз Fre3p и Fre5p, и мембранных белков Fit2p и Fit3p, отвечающих за удержание в клеточной стенке железа, связанного с сидерофорами. Полученные результаты указывают на важное адаптивное значение этих вариаций генов гомеостаза железа для физиологии хересных штаммов дрожжей, селекция которых сопровождалась адаптацией к росту на виноматериалах с низким содержанием железа, что характерно для сырья, получаемого из винограда в географических регионах традиционного хересного виноделия и важно для сохранения специфических качеств хересных вин.

Полученные данные расширяют наши представления об организации и эволюции генома винных штаммов дрожжей в условиях промышленной селекции, могут способствовать разработке стратегий направленного отбора и создания новых штаммов, совершенствованию технологий виноделия.

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант 16-16-00109).*

#### Литература

1. Эльдаров М.А., Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Успехи биологической химии, т. 56, 2016, с. 155–196.

2. Кишковская С.А., Эльдаров М.А., Думина М.В., Танащук Т.Н., Равин Н.В., Марданов А.В. Генетическая и физиолого-биохимическая характеристика коллекции штаммов хересных дрожжей. Прикладная биохимия и микробиология, т. 53(3), 217, 323-332.
3. Eldarov, M. A., Beletsky, A. V, Tanashchuk, T. N., Kishkovskaya, S. A., Ravin, N. V, & Mardanov, A. V. (2018). Whole-genome analysis of three yeast strains used for production of sherry-like wines revealed genetic traits specific to flor yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 9, 965.
4. Эльдаров, М., Белецкий, А., Равин, Н., & Марданов, А. (2019). Митохондриальные геномы хересных штаммов дрожжей характеризуются низкой генетической вариабельностью. *Генетика*, 55, 604–608.
5. Эльдаров М. А., Авданина Д. А., Шаламитский М. Ю., Иванова Е. В., Танащук Т. Н., Кишковская С. А., Равин Н.В., Марданов А. В. (2019). Полиморфизм генов гомеостаза железа и чувствительность к железу у хересных и винных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. *Микробиология*, 88(2), 217–223.

### Секция 3. Ресурсный биотехнологический потенциал микробного разнообразия

#### Литический потенциал везикул *Lysobacter capsici* ВКМ-2533<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Афошин А.С., <sup>1</sup>Кудрякова И.В., <sup>1,3</sup>Сузина Н.Е., <sup>1</sup>Шушкова Т.В.,  
<sup>1,3</sup>Лисов А.В., <sup>2</sup>Дудина Ю.И., <sup>3</sup>Боровикова А.О., <sup>1,3</sup>Леонтьевский А.А.,  
<sup>1</sup>Васильева Н.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»  
<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»;  
alex080686@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_183-184

Одной из задач по сдерживанию стремительного распространения антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов в современном обществе является поиск, выделение и изучение новых антимикробных веществ. Продуцентами таких веществ являются бактерии и грибы.

В ИБФМ РАН изучаются бактерии рода *Lysobacter*, продуцирующие различные литические агенты. Штамм *Lysobacter capsici* ВКМ-2533<sup>†</sup> обладает антибактериальной и антифунгальной активностью. Антимикробный потенциал этой бактерии может быть связан с продукцией бактериолитических ферментов, антибиотиков, а также со способностью образовывать внешнемембранные везикулы, которые могут нести в своем составе каждый из этих классов соединений. Целью настоящей работы было установить образует ли *L. capsici* везикулы и изучить их литический потенциал.

Методами электронной микроскопии была установлена способность *L. capsici* образовывать везикулы. Везикулы обладали мощной литической активностью в отношении грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus*), мицелиальных грибов (*Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger*) и дрожжей (*Candida boidinii*, *Candida utilis*). Было установлено, что вся антифунгальная активность культуральной жидкости *L. capsici* ассоциирована с везикулами. Это указывает на то, что антифунгальный агент может попадать в окружающую среду посредством везикул.

Известно, что везикулы могут быть гетерогенны по размеру, составу и отличаться по выполняемым функциям. Мы предположили, что антифунгальная и антибактериальная активности могут быть ассоциированы с функционально разными группами везикул. Для подтверждения этого препарат суммарных везикул был фракционирован в градиенте плотности сахарозы 30 – 55 %. В результате было получено 22 фракции. Методом электронной микроскопии установлено, что везикулы распределяются в средних фракциях градиента от 8 до 13. Все везикулярные фракции обладали мощной антибактериальной активностью и лишь одна фракция – девятая, обладала еще антифунгальной активностью. Данный факт указывает на то, что этот агент ассоциирован с определенной группой везикул.

Для выделения антифунгального агента из суммарной фракции везикул, была разработана схема очистки, включающая в себя методы многократной экстракции и обратно-фазовой ВЭЖХ. Выделенный антифунгальный агент обладал активностью в отношении ряда фитопатогенных грибов. Это делает его перспективным в области

защиты растений. Дальнейшие исследования будут направлены на установление структуры этого вещества.

## **Микробные композиции для биоконверсии отходов птицеводства и животноводства**

*Бабушкина О.А., Рафикова Г.Ф.*

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН), г. Уфа;  
zakaz@himteh.info

Интенсификация птицеводства и животноводства привела к производству значительного количества помета и навоза, содержащего экологически опасные компоненты. Существует немало технологий переработки органических отходов, однако они мало востребованы сельхозпроизводителями из-за своей дороговизны, трудоемкости и энергозатратности. До сих пор самым популярным методом утилизации продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственных птиц и животных в России является их складирование в специальных хранилищах с последующим внесением на поля. Использование такого навоза и помета без предварительной обработки неприемлемо с санитарно-гигиенической точки зрения, а также экономически нецелесообразно, т.к. сопровождается снижением содержания азота до 50-60%. Применение биологических технологий, а именно микробных композиций, для конверсии органических отходов позволит решить не только экологические проблемы, но и получить ценное органическое удобрение, повышающее плодородие почв.

Целью настоящего исследования стал скрининг активных протеолитических и молочнокислых штаммов бактерий и разработка на их основе микробных композиций для биоконверсии отходов птицеводства и животноводства в органическое удобрение.

Источниками для выделения активных штаммов микроорганизмов служили образцы почвы и растительных остатков. Выделение микроорганизмов проводилось путем посева водной суспензии образца на селективные питательные среды [1]. Для этого 10 г исследуемого образца помещали в стерильную воду объемом 90 мл и тщательно встряхивали. Далее отбирали 10 мл из полученной суспензии и переносили в соответствующий объем стерильной воды и т.д., получая серию разведений. После чего производили посев на агаризованные питательные среды. Для выделения молочнокислых бактерий использовали капустный агар, для выделения протеолитических микроорганизмов – среду МПА [1]. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре 37°C для молочнокислых бактерий и при температуре 28°C – для протеолитических. Определение способности к образованию спор проводили путем прогревания микробной суспензии при температуре 80°C и последующим ее посевом на питательную среду. Способность к синтезу протеолитических ферментов определяли посевом микроорганизмов на среду с желатиной [1].

Для создания композиций использовали отобранные штаммы протеолитических и молочнокислых микроорганизмов, а также штаммы бактерий из Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН и ЗАО НПП «Биомедхим». Микроорганизмы, составляющие основу композиций, культивировали на оптимальных средах и смешивали в одинаковых соотношениях. Титр каждого штамма бактерий в составе микробной композиции составлял  $10^8$ - $10^9$  КОЕ/мл.

С целью оценки эффективности микробных композиций для переработки органических отходов в условиях лабораторного эксперимента была произведена обработка образцов бесподстилочного навоза КРС (6 кг) из расчета 1 мл/кг и 5 мл/кг отхода. Количество вносимого рабочего раствора составляло 10 мл/кг отхода. В качестве контроля выступал образец отхода без внесения микробной композиции. В течение эксперимента производили регулярное перемешивание перерабатываемого отхода 1 раз в неделю. Пробы отбирали на 1, 5, 19 и 29 сутки после постановки опыта.

Численность бактерий группы кишечной палочки в перерабатываемом отходе определяли высевом на среду Эндо; сальмонелл – на Висмут-сульфит агар [1]. Фитотоксичность отхода оценивали по показателю всхожести и энергии прорастания семян редиса (*Raphanus sativum*) сорта «Розово-красный с белым кончиком» [2].

В ходе скрининга было выделено 23 штамма спорообразующих протеолитических и 5 штаммов молочнокислых бактерий. Из протеолитических бактерий было отобрано 3 наиболее активно разжижающих желатину, из молочнокислых – 2 штамма, обладающих наиболее высокой скоростью роста. На основании морфологических и физиолого-биохимических свойств штаммы протеолитических бактерий были отнесены к р. *Bacillus*, а штаммы молочнокислых бактерий – к р. *Lactobacillus*. Представители бацилл получили рабочие названия *Bacillus* sp. В-4, *Bacillus* sp. К1 и *Bacillus* sp. 14, представители лактобацилл – *Lactobacillus* sp. М-3 и *Lactobacillus* sp. М-8.

Для переработки органического отхода были составлены две микробные композиции. Композиция 1 состоит из штаммов: *Bacillus* sp. В-4, *Bacillus* sp. К1, *Bacillus* sp. 14, *Lactobacillus* sp. М-3, *Lactobacillus* sp. М-8, *Cellulomonas persica* ВМСН-ІВ-С-35, *Penibacillus ehimensis* ІВ 739. В состав композиции 2 вошли штаммы: *Bacillus* sp. В-4, *B. subtilis* ВМСН-ІВ-В-5, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ВМСН-ІВ-В-6, *Lactobacillus* sp. М-3, *Lactobacillus* sp. М-8, *Cellulomonas persica* ВМСН-ІВ-С-35, *Penibacillus ehimensis* ІВ 739.

При внесении органический отход микроорганизмы композиций показывали хорошую приживаемость. В вариантах с обработкой наблюдалось подавление роста бактерий группы кишечной палочки и сальмонелл при расходе 1 мл/кг, а также полное уничтожение патогенной микрофлоры при расходе 5 мл/кг через 29 суток эксперимента.

При обработке навоза композициями, особенно при более высоких нормах расхода, показатели всхожести и энергии прорастания семян редиса были выше, чем в контроле, что свидетельствует о снижении фитотоксичности отхода под влиянием микроорганизмов композиций (таблица).

Табл. Влияние биоферментации на фитотоксичность компоста через 29 суток

Варианты	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	60,0±2,5	75,0±3,4
Композиция 1 (расход - 1,0 мл/кг)	65,0±3,1*	75,0±3,3*
Композиция 2 (расход - 1,0 мл/кг)	67,5±3,2	80,0±3,7*
Композиция 1 (расход - 5,0 мл/кг)	77,5±3,5	85,0±4,2
Композиция 2 (расход - 5,0 мл/кг)	70,0±3,0	80,0±3,9*

Примечание. Звездочкой (\*) отмечены значения, не отличающиеся от контроля по критерию Стьюдента с достоверностью 0,95.

## Литература

1. Практикум по микробиологии / Ред. А.И. Нетрусов. М.: Академия, 2005. 602 с.

2. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д.Г. Звягинцев. М.: МГУ, 1991. 304 с.

## **Влияние биологических препаратов на рост сельскохозяйственных культур в одновидовых и смешанных посевах на ранних стадиях развития растений**

<sup>1</sup>*Багманов Р.Т.,* <sup>2</sup>*Кузина Е.В.,* <sup>2</sup>*Рафикова Г.Ф.*

<sup>1</sup>Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа; bniishufa@yandex.ru

<sup>2</sup>Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук; г. Уфа; biolab316@yandex.ru

На фоне роста цен на минеральные удобрения и средства защиты растений особого внимания заслуживают низкозатратные способы увеличения производства растениеводческой продукции. Так, экономически выгодно использовать смешанные посевы злаковых и бобовых культур, поскольку это способствует росту урожайности и качества получаемой продукции. В то же время продуктивность смешанных посевов можно значительно повысить за счет применения биологических препаратов, которые оптимизируют минеральное питание растений и усиливают устойчивость сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам внешней среды. Как правило, наиболее заметно влияние биопрепаратов на рост и развитие растений прослеживается на начальных этапах онтогенеза.

Целью исследования было изучение влияния биологических препаратов на физиологические показатели растений пшеницы, гороха и люпина при выращивании их в одновидовых и смешанных посевах.

Исследования проводили в 2019 г. на опытном поле Чишминского селекционного центра Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН. Почва – чернозем выщелоченный. Повторность опытов – четырехкратная, размещение рандомизированное. В начале вегетации растений наблюдалась повышенная по сравнению со среднемноголетними значениями температура. Объектами исследований служили пшеница яровая Экада 113, горох посевной Чишминский 229, люпин белый Дега. Нормы высева в чистых и смешанных посевах соответствовали рекомендациям для южной лесостепной зоны Республики Башкортостан. Для обработки семян и опрыскивания посевов по вегетации использовали следующие биологические препараты фунгицидного и ростстимулирующего действия: пестицид «Елена», Ж, микробиологическое удобрение «Азолен», Ж, регулятор роста растений «Бациспектин БМ», П, а также химический фунгицид Скарлет, МЭ (100 г/л имазалила + 60 г/л тебуконазола). Нормы расхода препаратов рассчитывали исходя из рекомендуемых регламентов применения. В опыте не использовали препараты, содержащие клубеньковые бактерии. Учет зеленой массы растений проводили в фазе кущения пшеницы.

По результатам эксперимента установлено, что совместное выращивание пшеницы и гороха не оказывало влияния на рост надземной биомассы и корневой системы данных растений (табл.). При этом отмечено, что в смешанных посевах яровой пшеницы и люпина продуктивность последнего по зеленой массе выше на 22,9 %, чем в чистой культуре.

Использование биологических препаратов оказалось оправданным как в одновидовых, так и в смешанных посевах. Так, на продуктивность зеленой массы и рост корневой системы яровой пшеницы в обоих видах смешанных посевов благоприятно влияло внесение таких биопрепаратов как «Азолен» и «Бациспецин БМ». Применение препаратов «Елена», «Азолен», «Бациспецин БМ» на смешанных посевах яровой пшеницы и гороха также способствовало росту зеленой массы зернобобовой культуры (на 15,2-30,4 % по сравнению с чистыми посевами гороха). При этом данный способ возделывания показал себя более продуктивным, чем использование вышеперечисленных биологических препаратов на чистых посевах гороха, а также выращивание гороха в смеси с пшеницей, без задействования биологических средств защиты растений.

Табл. Влияние обработки препаратами на массу растений (сухое вещество) в одновидовых и смешанных посевах в фазе кущения, г

Чистая культура, смешанный посев	Зеленая масса				
	Корни				
	Контроль (без обработки)	Скарлет	«Елена»	«Азолен»	«Бациспецин БМ»
Пшеница	$\frac{0,18}{0,04}$	$\frac{0,21}{0,06}$	$\frac{0,22}{0,07}$	$\frac{0,22}{0,07}$	$\frac{0,26^*}{0,07}$
Горох	$\frac{0,46}{0,09}$	$\frac{0,39}{0,08}$	$\frac{0,46}{0,13}$	$\frac{0,45}{0,15^*}$	$\frac{0,46}{0,10}$
Люпин	$\frac{0,48}{\text{нд}}$	$\frac{0,32^*}{\text{нд}}$	$\frac{0,57^*}{\text{нд}}$	$\frac{0,57^*}{\text{нд}}$	$\frac{0,43}{\text{нд}}$
Пшеница + горох	$\frac{0,19}{0,07} + \frac{0,44}{0,11}$	$\frac{0,20}{0,10} + \frac{0,39}{0,13}$	$\frac{0,21}{0,06} + \frac{0,60^*}{0,14}$	$\frac{0,29^*}{0,13^*} + \frac{0,53^*}{0,19^*}$	$\frac{0,24^*}{0,15^*} + \frac{0,56^*}{0,11}$
Пшеница + люпин	$\frac{0,20}{0,06} + \frac{0,59}{\text{нд}}$	$\frac{0,17}{0,08} + \frac{0,33^*}{\text{нд}}$	$\frac{0,20}{0,07} + \frac{0,61}{\text{нд}}$	$\frac{0,25^*}{0,12^*} + \frac{0,59}{\text{нд}}$	$\frac{0,25^*}{0,13^*} + \frac{0,55}{\text{нд}}$

\*Различия с контролем статистически значимы при  $p \leq 0,05$ , нд – нет данных.

Для люпина установлено, что биопрепараты «Елена» и «Азолен» стимулируют рост зеленой массы растения в чистой культуре на 18,8 % по сравнению с контролем, но при этом в смешанных посевах люпина и пшеницы статистически значимых отличий по весу зеленой массы между вариантами, где использовали биопрепараты и без их применения не выявлено.

Для химического фунгицида Скарлет, МЭ было отмечено наличие фитотоксичности в отношении бобовых культур, как в одновидовых, так и в смешанных посевах. Наиболее чувствительным к воздействию препарата оказался люпин, что выражалось в значительном торможении роста растений (табл.).

В результате эксперимента было показано также, что обработка семян биопрепаратами способствовала развитию корневой массы пшеницы и гороха как в чистых культурах, так и в смеси, а также повышала устойчивость растений к корневым гнилям. Эффективность исследуемых препаратов против корневых гнилей в фазе кущения составляла 35,7-45,3 %.

В целом, в ходе проведенных исследований было установлено, что в агроклиматических условиях южной лесостепной зоны Республики Башкортостан эффективным является выращивание яровой пшеницы в смеси с горохом с применением биологических препаратов «Азолен» и «Бациспецин БМ». Для того чтобы повысить продуктивность накопления зеленой массы люпина на чистых посевах рекомендуется использовать биопрепараты «Елена» и «Азолен».

## Киллер-токсин *Yarrowia lipolytica*

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
biryukovae05@rambler.ru

В природе между различными группами микроорганизмов устанавливаются определенные взаимоотношения, от характера которых зависит существование биоценоза. Некоторые из них способны продуцировать антимикробные вещества, киллер-токсины, подавляющие рост других организмов. В настоящее время киллерная активность обнаружена у бактерий [1], головневых грибов [2], парамеций и миксомицетов [3].

Объектом данного исследования были выбраны дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые являются продуцентами многих практически ценных соединений (органических кислот, липаз, цитохрома *c*, L-лактат оксидазы и др.).

В данной работе впервые было обнаружено еще одно свойство *Y. lipolytica* – способность синтезировать киллер-токсин.

Изучение микроорганизмов, продуцирующих микоцины, актуально, поскольку они успешно применяются для борьбы с аборигенными штаммами в пищевой промышленности и виноделии [3], для производства антибиотиков, [4], а также для биоремедиации окружающей среды [4] и т.п.

Дрожжи *Y. lipolytica* Y-2378 выращивали на солевой среде Ридер, содержащей глюкозу (1%), манит (2.5%) и фосфат-цитратный буфер (pH 4.5-5.0). Культуральную жидкость после 72 ч роста центрифугировали, осадок отбрасывали, а из фугата выделяли киллер-токсин. Токсин осаждали охлажденным этанолом (96%) в диапазоне концентраций 50-75%, осадок растворяли в фосфат-цитратном буфере (pH 4.5) и очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе. Активная фракция была собрана в виде единичного пика. По данным SDS - электрофореза молекулярная масса составила 18-19 кДа. Киллерную активность дрожжей оценивали по зоне ингибирования роста тест-микроорганизмов путем посева на агаризованные питательные среды. За единицу киллерной активности принимали 1 мм зоны ингибирования тест-культур.

Очищенный препарат проявлял чувствительность к нагреванию, действию протеаз. Сывороточный альбумин оказывал протекторные свойства на указанные воздействия. Эти данные указывают на белковую природу токсина из дрожжей *Y. lipolytica* Y-2378.

Результаты действия микоцина, выделенного из *Y. lipolytica* Y-2378 представлены в таблице и на рис. 1.



Рис. 1. Антимикробная активность *Y. lipolytica* Y-2378. Время роста тест-микроорганизма *S. cerevisiae* - 48 ч.

Табл. Спектр действия микоцина *Y. lipolytica* Y-2378

Название микроорганизма	Чувствительность к микоцину
<i>Y. lipolytica</i> - 69	-
<i>Y. lipolytica</i> Y- 47	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-381	+
<i>Candida rugosa</i> Y-67	-
<i>Candida utilis</i> Y-769	+
<i>Candida guilliermondii</i> Y-1477	-
<i>Candida padubecina</i> Y-2443	-
<i>Candida mycoderma</i> Y-240	-
<i>Candida albicans</i> Y-2994	+
<i>Fusarium decemcellulare</i> ВКМ F-1179	+
<i>Rhizoctonia solani</i> ВКМ F-895	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГИСК 453	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-
<i>Enterococcus duran</i> ВКМ В-603	-

Примечание: (+) - культура чувствительна; (-) - культура не чувствительна.

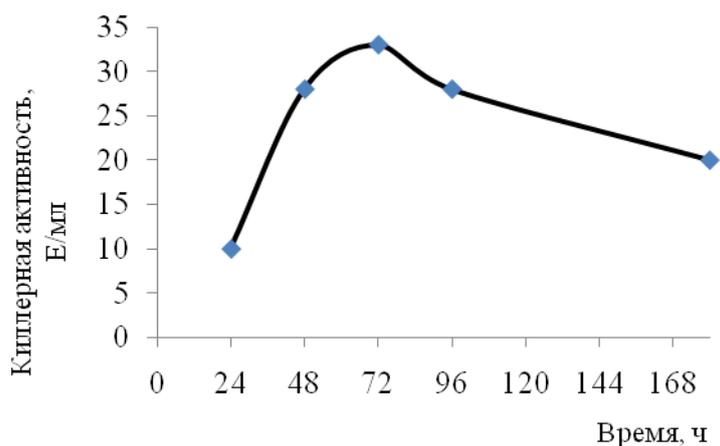


Рис. 2. Динамика накопления микоцина в культуральной жидкости *Y. lipolytica* Y-2378.

На рис. 2 отображена динамика накопления микоцина в культуральной жидкости *Y. lipolytica* Y-2378. Максимальное количество токсина образовывалось на 72 ч роста дрожжей. Уровень биосинтеза токсина зависел от pH, температуры и концентрации NaCl.

Таким образом, обнаружен киллер-токсин из *Y. lipolytica* Y-2378, подавляющий рост бактерий, дрожжей и грибов.

## Литература

1. Konisky J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action // Annu. Rev. Microbiol. 1982. V. 36. P. 125-144.
2. Koltin Y., Day P.R. Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins // Appl. Microbiol. 1975. V. 30 № 4. P. 694-696.
3. Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin // Cell. 2002. V. 108. № 3. P. 395-405.
4. Magliani W., Conti S., Travassos L.R., Polonelli L. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond // FEMS Microbiol Lett. 2008. V. 288 № 1. P. 1-8.

### **Роль алкан гидроксилаз ALK В и CYP153 в процессе деструкции алканов штаммом *Gordonia* sp. 1D**

*Ветрова А.А., Делеган Я.А., Петриков К.В., Иванова А.А.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
phdvetrova@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_190-191

Штаммы *Gordonia* являются известными деструкторами алканов. Так как алканы являются основными (около 70%) составляющими большинства добываемой нефти, эти микроорганизмы играют важную роль в биоремедиации загрязненных нефтью территорий. Алкангидроксилазы – обширный класс ферментов деградации алканов, представленный в различных видах бактерий, грибов, дрожжей и водорослей. Ван Бейлен и Фанхофф рассматривают три основных категории алкан-деградирующих ферментных систем: разлагающие C1-C4 соединения (от метана до бутана, окисляются ферментами метанмонооксигеназного типа), C5-C16 соединения (от пентана до гексадекана, окисляются межмембранными ферментами с негемовым железом (семейство AlkB) или цитохромом P450 (семейство CYP153) и C17+ (длинноцепочечные алканы, окисляются малоизученными ферментными системами). В данной статье также отмечено, что микроорганизмы, способные разрушать алканы, могут содержать несколько алкангидроксилаз и, таким образом, потреблять различные субстраты. Часто бактерии обладают генами только одной из вышеперечисленных систем, хотя и в нескольких копиях, что приводит к специфическому спектру утилизируемых алканов.

Штамм *Gordonia* sp. 1D способен утилизировать широкий спектр алканов в диапазоне температур культивирования 20-50°C. При анализе генома штамма выявлено присутствие генов нескольких различных алкан гидроксилаз — alkB, CYP153, а также генов нескольких менее распространенных гидроксилаз. Целью данной работы было получение мутантных штаммов (дефектных по генам alkB, CYP153) и исследование роли алкан гидроксилаз в процессе деструкции углеводов нефти родительским и мутантными штаммами *Gordonia* sp. 1D. Исследуемые штаммы были проанализированы на способность утилизировать различные алифатические углеводороды при температурах 24°C и 45°C через 10 суток.

Штамм *Gordonia* sp. 1D способен к деструкции алканов C8-C20 (до C36) при двух температурах, что позволяет предположить, что оба гидроксилазных фермента активны в клетках как при температуре 24°C, так и при 45 °C. Мутантный штамм по гену alkB утратил способность утилизировать алканы длиной до C10, в отличие от мутантного микроорганизма по гену CYP153. Вероятно, в микроорганизме *Gordonia* sp. 1D субстратами гидроксилазы alkB в основном являются линейные алканы длиной C8-C12,

что частично согласуется с данными Ван Бейлена. Были получены кривые роста и степень деградации углеводородов нефти мутантными и природным штаммами при росте в жидкой минеральной среде с нефтью при температурах 24°C и 45°C в течении 10 суток.

Аборигенный штамм *Gordonia* sp. 1D, имеющий гены *alkB* и *CYP153*, наиболее активно размножался при умеренной температуре (24°C), что соотносилось с максимальным значением показателя степени деградации нефти (37%). Степень деградации нефти при комнатной температуре для мутантных штаммов по генам *alkB* и *CYP153* составила, соответственно 23% и 17%.

С повышением температуры растворимость углеводородов нефти в воде повышается. При температуре 45 °С алканы длиной до C12 (являющиеся наиболее токсичными), входящими в состав нефти, активно влияют на культуру. Аборигенный штамм *Gordonia* sp. 1D имеет преимущество относительно мутантного микроорганизма по гену *alkB*, так как способен к деградации алканов до C12, что подтверждается данными показателей степени деградации и динамики роста. Микроорганизм мутантный по гену *alkB* в большей степени подвергается токсическому воздействию легких фракций нефти при повышенной температуре, поэтому прирост биомассы штамма *Gordonia* sp. 1D *alkB*-наблюдается только через 100 часов. Данное явление вероятно обусловлено абиотической убылью токсичных алканов легкой фракций нефти из анализируемой системы. Вероятно, алкан гидроксилаза, кодируемая геном *alkB* является температурозависимой, и снижает свою активность с повышением температуры, что способствует увеличению степени деградации нефти штаммом *Gordonia* sp. 1D при температуре 24°C, по сравнению с 45°C.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ мол\_a № 18-34-00329.*

## **Использование сверхмалых концентраций биологически активных веществ синергетического действия для интенсификации биотехнологических производств**

*Глухих С.А.*

Центр промышленного внедрения прикладных разработок НИИ РАН «БИОЦЕНТР-САС»,  
г. Пущино, @yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_191-194

Имеется большое количество публикаций о чувствительности микробиологических объектов к химическим и физическим воздействиям. Объекты биологии реагируют на освещение определенного спектра, на излучение некоторых частотных диапазонов, на наличие статического электричества и магнитного поля, на присутствие пептидов, гормонов, ядов в концентрациях нано-уровня и более низких. Эти явления укладываются в рамки современных представлений о клеточной регуляции. Реакции на воздействие сверхмалых доз (СМД) биологически активных веществ (БАВ) предполагают наличие у организмов множества мишеней и соответствующих путей на различных иерархических уровнях систем регуляции (Бурлакова с соавт., 1990). Эти свойства БАВ в перспективе имеют практические следствия, в частности, при сохранении активности лекарственных препаратов исчезают побочные эффекты от их применения. Для физических факторов, например, облучения, эффект усиливается с понижением интенсивности воздействия в определенных пределах.

Воздействие сверхмалых доз биологически активных веществ или композиций биологически активных стимуляторов (КБС) обнаружено также для микроорганизмов. Превосходные результаты в микробной биотехнологии показали композиционные биостимуляторы, интенсифицируя процессы производства кормовых дрожжей на

спиртовой барде и отрубях, производство ферментов и спиртовое брожение дрожжами, увеличивая продукцию этанола и снижая количество примесей в готовом продукте. В то же время, этот метод не менее интересен для интенсификации производственных процессов на основе бактериальных штаммов.

Прежде всего, необходимо уточнить, что СМД – это дозы, эффективность которых необъяснима с современных позиций науки и требует дальнейшей разработки. Граница СМД определяется числом молекул БАВ на клетку. В одном моле вещества около  $6 \cdot 10^{23}$  молекул, а число клеток в любом многоклеточном организме (например, животного) по порядку величин составляет примерно  $10^{10}$ , так что при введении БАВ в организм в дозах  $10^{-12} - 10^{-13}$  М на одну клетку приходится от 10 до одной молекулы БАВ. Поэтому СМД отвечают концентрации  $10^{-12}$  М и ниже. Особый интерес представляет изучение совместного действия двух или более химических агентов в сверхмалых и подпороговых дозах, а также совместное действие слабых полей и низких концентраций биологически активных веществ (явление синергизма).

В данной работе в связи с большим интересом, проявляемым в последние годы к процессу биосинтеза микробного белка с использованием в качестве источников углерода метана и метанола, изучали влияние КБС на рост галотолерантного облигатного метанотрофа *Methylococcum alcaliphilum* 20Z VKM В-2133. Культивирование проводили в колбах объёмом 100 мл на минеральной среде с ежесуточной подачей метана или метанола (0,5% об/об) с замером оптической плотности при  $\lambda = 600$  нм. Для тестирования использовали стерильные растворы КБС в 3-х концентрациях. Результаты исследования представлены в Таблице 1

Эффект от воздействия КБС имеет нелинейный характер, очевидны спады, и разные уровни проявления эффекта, включая присутствие зон отсутствия эффекта – характерные для СМД «мертвые зоны». В нашем исследовании более явно проявился эффект от воздействия наиболее разбавленного КБС. Учитывая, что КБС – это композиция из нескольких БАВ, каждое вещество которой имеет свою собственную частоту воздействия, под которую при создании КБС рассчитывалась концентрация. Эта концентрация находится в зоне синергизма суммарного проявления ингредиентов композиции на биологические процессы и как следствие, на биотехнологическое производство.

Табл. 1. Рост *Methylococcum alcaliphilum* 20Z на метане в присутствии КБС\*

Время культивирования, сут	Контроль, Без КБС	Опыт, КБС Разбавление $10^{-6}$	Опыт, КБС Разбавление $10^{-8}$	Опыт, КБС Разбавление $10^{-11}$
0	0,16	0,15	0,16	0,16
1	0,47	1,08	0,53	1,21
2	1,04	2,22	1,21	2,48
3	1,53	3,15	2,07	3,42
4	2,33	3,52	2,22	4,06
5	2,45	3,99	3,00	4,41
6	3,02	4,71	3,51	5,42
7	3,25	5,23	4,19	6,51

8	3,52	5,61	5,23	6,52
9	4,03	5,72	5,12	6,82
10	4,39	6,01	5,23	7,20

Табл. 2. Рост *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z на метаноле в присутствии в КБС\*

Время культивирования, сут	Контроль, без КБС	Опыт, КБС	Опыт, КБС	Опыт, КБС
		Разбавление $10^{-6}$	Разбавление $10^{-8}$	Разбавление $10^{-11}$
0	0,25	0,2	0,22	0,23
1	1,06	1,16	0,93	1,20
2	1,52	1,71	1,51	1,74
3	2,65	2,74	2,42	3,24
4	3,50	4,06	3,21	4,80
5	4,42	5,60	4,02	6,48
6	6,25	5,93	7,81	11,00
7	5,85	8,59	6,41	9,82
8	6,61	8,83	6,54	11,16
9	6,12	8,91	6,59	10,22
10	6,59	9,01	6,51	11,01

\*Навеска КБС составила 0,24 г

Фазовая микроскопия опытной и контрольной культур метанотрофа выявила, что клетки при росте в присутствии КБС характеризуются более высокой плотностью, что может свидетельствовать о более высоком содержании мембран.

Аналогичные результаты были получены при изучении воздействия сверхмалых концентраций КБС на рост продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum*.

Интенсификация процесса роста микроорганизмов-продуцентов целевых продуктов позволяет сократить сроки наработки биомассы и увеличить объемы выпуска. В конечном счёте, это приводит к росту производственной мощности биотехнологического предприятия за счет увеличения коэффициента оборачиваемости оборудования, к росту производительности и экономической эффективности, что не может не сказаться на конкурентных и ценовых преимуществах продукции на рынке сбыта.

## Литература

1. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Воздействие химических агентов в сверхмалых дозах на биологические объекты. Известия АН СССР, Серия биологическая, 1990, №2, С.184-193.

### **Поиск грибов и бактерий, разлагающих промышленные полимерные материалы**

*Дубонос А.В.<sup>1</sup>, Красотина И.В.<sup>2</sup>, Черных А.М.<sup>3</sup>, Коломыцева М.П.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова;

<sup>2</sup>Рязанский Государственный Университет им. С.А. Есенина;

<sup>3</sup>ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; mkolomytseva@rambler.ru

В настоящее время аэробные микроорганизмы используются в самых разных направлениях современной биотехнологии, благодаря наличию разнообразных вариантов цикла обмена веществ, легкостью культивирования и неприхотливостью. Одним из перспективных направлений их применения является биodeградация сложных антропогенных веществ: продуктов нефтеперерабатывающей промышленности, токсичных отходов химической и фармацевтической промышленности, а также полимерных материалов. Исследования в этой области в будущем могут значительно повлиять на решение проблемы загрязнения окружающей среды.

По данным на 2018 год, в год во всем мире производится около 380 миллионов тонн пластика. С 1950 года по 2018, было произведено около 6.3 миллиардов тонн пластика, из них было переработано около 9%, а сожжено - 12 % (1). В соответствии с данными Агентства по охране окружающей среды США, в 2011 году пластмассы составили более 12 % твёрдых бытовых отходов, тогда как в 1960-х годах пластмассы составляли менее 1 % твёрдых бытовых отходов. Большое количество изделий из пластика, производимых каждый год, предназначено для одноразового использования. Часто потребители различных видов пластмассовых изделий используют их единожды, а затем выбрасывают или заменяют их.

Пластиковое загрязнение представлено множеством форм, в том числе засорением водоёмов (выбрасывание отходов в реки, озёра, моря, океаны), почв, грунтовых вод и так далее (2). Медленно разлагаясь в почве, пластик может выделять вредные химические вещества, которые пагубно воздействуют на окружающие организмы, а также могут просачиваться в грунтовые воды, делая их непригодными для питья (3). Попадая в океан, пластиковые отходы частично разлагаются, при этом некоторые виды способны выделять токсичные химические вещества (4). Опасность пластикового загрязнения для животных состоит не только в выделении в окружающую среду токсичных веществ, но и к закупорке пищеварительного тракта в следствие заглатывания и к удушьям (5-6).

Для борьбы с пластиковым загрязнением окружающей среды применяются различные меры, и уже около 40 стран ввели запрет или ограничение на продажу и(или) производство пластиковых пакетов.

Биodeградация пластика является перспективным и активно развивающимся направлением в последнее десятилетие. Поиск новых активных микроорганизмов, способных разлагать различные виды пластика, и их модификация становится все более востребованными в мире.

В настоящей работе было протестировано 39 культур микроорганизмов (23 грибные культуры рода *Penicillium*, *Fusarium*, *Gibberellazeae* и *Rhizoctonia*, 13 культур грамположительных бактерий родов *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Dietzia* и *Bacillus*), а также 6 образцов почвы из загрязненных полимерными отходами мест Московской и Челябинской областей на способность разлагать поликапролактон (ПКЛ), полиэтилен (ПЭ), полипропилен (ПП) и полиэтилентерефталат (ПЭТ).

В ходе работы были опробованы и успешно применены методики скрининга микроорганизмов, обладающих липазной или эстеразной активностями на агаризованной среде, методика культивирования микроорганизмов в минеральной среде с пластиком в качестве единственного источника углерода, методики измерения эстеразной активности путем детектирования терефталевой кислоты и интермедиатов трансформации 4-нитрофенил ацетата.

Отобраны для дальнейшей работы наиболее перспективные штаммы микроорганизмов. Наиболее активными культурами в отношении исследуемых пластиков оказались грибы рода *Penicillium* и *Fusarium*, а также актиномицеты рода *Streptomyces*. Выделены из накопительных культур 2 микроорганизма, разлагающих полимерные соединения.

#### Литература

1. The known unknowns of plastic pollution, The Economist. <https://www.economist.com/international/2018/03/03/the-known-unknowns-of-plastic-pollution>
2. J. Hopewell, R. Dvorak and E. Kosior. Plastics recycling: challenges and opportunities Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Jul 27; 364(1526): 2115–2126. doi: 10.1098/rstb.2008.0311
3. Aggarwal Poonam Interactive Environmental Education Book VIII. Pitambar Publishing. p. 86. ISBN 8120913736
4. G. Knight Plastic Pollution, Raintree Publishers, 2013, p.64, ISBN140623513X, 9781406235135
5. Jr. Karleskint George, Richard Turner, James Small, Small Karleskint Turner Introduction to Marine Biology (4th Edition) Hardcover, 576 Pages, 2012, Cengage Learning, ISBN-13: 978-1-133-36446-7, ISBN: 1-133-36446-2
6. J.G.B Derraik, Marine Pollution Bulletin. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Volume 44, Issue 9, September 2002, Pages 842-852

#### **Биовыщелачивание медно-цинкового мышьяк-содержащего концентрата**

<sup>2,3</sup>Елкина Ю.А., <sup>1,2</sup>Нечаева А.В., <sup>2</sup>Меламуд В.С., <sup>2,3</sup>\*Булаев А.Г.

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

<sup>2</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, г. Москва; \*bulaev.inmi@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_195-197

Цветные металлы из сульфидных руд извлекаются, главным образом, с помощью пирометаллургических технологий, но для пирометаллургии является проблемой переработка мышьяк-содержащих руд и труднообогатимых полиметаллических руд, из которых невозможно получить кондиционные концентраты из-за взаимного прорастания

сульфидных минералов. Биогидрометаллургические технологии широко применяются для переработки мышьяк-содержащих золотосодержащих концентратов, а также для извлечения цветных металлов из некондиционных концентратов, в частности, мышьяк-содержащих.

Целью данной работы являлось проведение процесса биовыщелачивания медно-цинкового мышьяк-содержащего концентрата при различных температурах и в присутствии различных дополнительных источников углерода (CO<sub>2</sub> и меласса).

Основными сульфидными минералами концентрата являлись пирит, халькопирит, теннантит и сфалерит. Концентрат содержал 24,40% Fe, 6,20% Cu, 7,30% Zn и 1,70% As. Процесс биоокисления концентрата проводили в периодическом режиме в лабораторных реакторах объемом 2,5 л при следующих параметрах: аэрация – 5 л/мин, скорости вращения турбинной мешалки – 500 об/мин. Температуры составляли 40, 45, 50, 55 и 60°C. Плотность пульпы (Т : Ж) составляла 1 : 10 (100 г концентрата на 1000 мл жидкой среды). Время пребывания составляло 40 сут.

В качестве инокулята использовали микробную культуру, сформировавшуюся в процессе биоокисления того же сульфидного концентрата при 40°C в проточном режиме, в которой преобладали ацидофильные бактерии *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfobacillus* spp., а также археи *Ferroplasma acidiphilum* и *Acidiplasma* sp. Инокулят вносили в реакторы в таком объеме, чтобы начальная численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе составляла 1×10<sup>8</sup> кл/мл. В пульпу первого реактора осуществляли подачу CO<sub>2</sub> (примерно 0,01 л/мин). В пульпу второго вносили 0,02% мелассы (в начале эксперимента, на 10, 20 и 30 сутки). В контрольный реактор не вносили каких-либо дополнительных источников углерода. При проведении процессов биоокисления определяли параметры жидкой фазы пульпы биоокисления, которые позволяют оценить активность биоокисления (рН, Eh, концентрацию ионов Fe<sup>3+</sup> и Fe<sup>2+</sup>, а также мышьяка). При необходимости рН пульпы регулировали путем добавления серной кислоты или карбоната кальция. Численность клеток микроорганизмов определяли прямым подсчетом с помощью фазово-контрастного микроскопа Carl Zeis Jena (×1600).

Параметры жидкой фазы реакторов представлены в Таблице 1, степени извлечения цветных металлов в Таблице 2.

Табл. 1 – Параметры жидкой фазы пульпы в конце эксперимента (на 40 сутки)

Температура	Источник углерода	рН	Eh	Fe <sup>3+</sup> , г/л	Fe <sup>2+</sup> , г/л	As, г/л	Cu <sup>2+</sup> , г/л	Zn <sup>2+</sup> , г/л
40°C	CO <sub>2</sub>	1,08	775	16,3	0,04	0,42	1,21	5,65
	Меласса	1,04	777	15,5	0,00	0,41	1,25	5,83
	Контроль	1,05	773	15,2	0,00	0,42	1,16	5,80
45°C	CO <sub>2</sub>	1,04	802	18,7	0,03	0,46	1,52	5,74
	Меласса	1,08	804	15,8	0,00	0,44	1,62	5,76
	Контроль	1,05	792	15,8	0,06	0,43	1,43	5,99
50°C	CO <sub>2</sub>	1,04	805	17,6	0,06	0,48	1,58	5,19
	Меласса	1,02	800	14,6	0,14	0,44	1,67	4,94
	Контроль	0,97	802	16,1	0,03	0,46	1,48	4,97
55°C	CO <sub>2</sub>	1,26	832	9,59	0,35	0,35	1,38	5,14
	Меласса	1,37	804	4,97	1,54	0,24	1,25	4,89
	Контроль	1,91	760	1,12	3,22	0,02	1,35	5,15
60°C	CO <sub>2</sub>	2,31	584	0,28	2,14	0,01	1,40	4,93
	Меласса	2,54	562	0,14	0,95	0,01	0,69	3,42
	Контроль	2,52	566	0,08	0,63	0,01	0,62	3,16

Табл. 2 – Степени извлечения меди и цинка в раствор, % (на 40 сутки)

Температура	Источник углерода	Cu	Zn
40°C	CO <sub>2</sub>	16,6	91,1
	Меласса	20,2	94,0
	Контроль	18,7	93,5
45°C	CO <sub>2</sub>	24,5	92,6
	Меласса	26,1	92,9
	Контроль	23,1	96,6
50°C	CO <sub>2</sub>	25,5	83,7
	Меласса	26,9	79,7
	Контроль	23,9	80,2
55°C	CO <sub>2</sub>	22,3	82,9
	Меласса	20,2	78,9
	Контроль	21,8	83,1
60°C	CO <sub>2</sub>	22,6	79,4
	Меласса	11,1	55,2
	Контроль	10,0	51,0

Как видно из представленных данных, степени извлечения металлов не различались значительно в реакторах с разными источниками углерода. При этом с повышением температуры степени извлечения металлов снижались, вероятно, из-за уменьшения активности микроорганизмов. При этом, несмотря на то, что степени извлечения меди и цинка при 60°C оставались высокими, концентрация мышьяка снижалась, что указывает на то, что его выщелачивание в большей степени определялось активностью микроорганизмов, чем других элементов.

*Исследование было выполнено при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук № МК-6639.2018.8.*

## **Конструирование флуоресцентных сенсоров, реплицируемых в *Pseudomonas***

<sup>1</sup>*Иванова Е.В.,* <sup>2</sup>*Фролова А.А.,* <sup>2</sup>*Позднякова-Филатова И.Ю.*

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», г. Тула; ivanova05evgenia99@yandex.ru

<sup>2</sup> ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино

В процессе деятельности человека производится множество устойчивых органических соединений, одним из которых является салицилат. Он участвует в регуляции таких клеточных процессов, как формирование фенотипа множественной антибиотикоустойчивости и бактериальной персистенции. Салицилат может увеличить минимальную ингибирующую концентрацию антибиотиков путем индукции активатора множественной антибиотикорезистентности MagA. В аэробных условиях он индуцирует образование активных форм кислорода, что приводит к увеличению персистенции клеток. Они играют важную роль в хронических инфекциях, поскольку могут проявлять устойчивость при лечении антибиотиками и восстановить популяцию после прекращения лечения. Поэтому из-за повсеместного бесконтрольного использования салицилата и его

предшественников необходимо следить за его содержанием в объектах окружающей среды.

Бактерии обладают способностью воспринимать химические вещества окружающей среды с помощью сложных регуляторных цепей. У *Pseudomonas* есть системы деструкции салицилата и специфические регуляторы *LysR*-семейства, которые активируют гены деструкции в присутствии салицилата. Это свойство используют при конструировании плазмид, в которых репортерный белок Gfp находится под контролем таких специфических регуляторов. Биосенсорами являются в основном штаммы *E.coli*, модифицированные описанными выше плазмидами. Однако было обнаружено, что РНК-полимераза *E.coli* взаимодействует с промотором генов деструкции салицилата *Pseudomonas* хуже, чем РНК-полимераза самих *Pseudomonas*. Из чего был сделан вывод, что у используемых сенсоров можно увеличить аналитические характеристики (минимально определяемые количества, селективность и др.), если заменить *E.coli* на *Pseudomonas*.

Для проверки этого в первую очередь было необходимо сконструировать плазмиды, способные реплицироваться в *Pseudomonas*. Брали плазмиды: *sgpR\_sgp(AK5)::gfp*, *nahR\_nahG(AK5)::gfp* и *nahR\_nahG(G7)::gfp*, имеющие в себе регуляторы генов деградации нафталина и салицилата SgpR (AK5), NahR (AK5), NahR (G7) и репортерный белок Gfp. Создание конструкции заключалось в присоединении к ориджину репликации *E.coli* ориджина репликации *Pseudomonas*. Далее методом электропорации были модифицированы штаммы *Pseudomonas*: *P.sgpR\_sgp(AK5)::gfp*, *P.nahR\_nahG(AK5)::gfp* и *P.nahR\_nahG(G7)::gfp*. Измерили флуоресценцию у модифицированных штаммов. Изменение уровня флуоресценции в отсутствии/присутствии салицилата оказалось сравнимо с таковым у *E.coli*.

## Микробная сульфатредукция в отходах свинокомплекса

<sup>1</sup>Карначук О.В., <sup>1</sup>Панова И.А., <sup>1</sup>Зюсман В., <sup>1</sup>Кадырбаев М., <sup>2</sup>Груздев Е.В.,  
<sup>2</sup>Кадников В.В., <sup>3</sup>Пименов Н.В., <sup>2</sup>Равин Н.В.

<sup>1</sup>Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, г. Томск; olga.karnachuk@green.tsu.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_198-200

<sup>2</sup> Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

<sup>3</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Высокотоксичный сероводород является одним из основных компонентов неприятного запаха в местах складирования сельскохозяйственных отходов. В природных биотопах большая часть H<sub>2</sub>S образуется за счет восстановления сульфата (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) и лишь небольшая доля сульфидов поступает из серосодержащих аминокислот, входящих в состав белков. Разница в масштабах образования сероводорода связана с энергетическим метаболизмом. Для образования достаточного количества энергии СРБ должны восстанавливать большие количества сульфата – конечного акцептора электронов при окислении органических веществ или водорода.

В литературе имеются единичные данные о присутствии СРБ в свином навозе и их активности. Цель исследования состояла в определении разнообразия и активности СРБ в кумулятивных отходах крупного свинокомплекса «Томский» (Сибирская аграрная группа), с численностью животных 176 тыс. голов. Сильный запах от мест складирования отходов достигает города Томска и является причиной активных дискуссий населения.

Параллельно с отбором проб для микробиологического анализа, измеряли концентрацию  $\text{H}_2\text{S}$  в воздухе газоанализатором в непосредственной близости от пруда-накопителя отходов. Измерения проводили в период после схода снегового покрова, начиная с мая до ноября 2019 года. В мае отсутствовали следы сероводорода, его присутствие обнаруживали, начиная с июня. Измеренная нами концентрация  $\text{H}_2\text{S}$  в воздухе в окрестностях прудов-накопителей колебалась от 0.08 до 0.69  $\text{мгH}_2\text{S/м}^3$ , превышая предельно допустимую концентрацию (ПДК) для воздуха населенных мест, 0.008  $\text{мгH}_2\text{S/м}^3$ , почти в сто раз.

Скорость диссимиляционной сульфатредукции, определенная с радиоактивно-меченным сульфатом в жидких отходах, поступающих в пруды-накопители, составляла 0.06  $\text{ммоль/л/сутки}$ . Большинство метки накапливалось в кислоторастворимой фракции сульфидов и моносльфидов.

С помощью высокопроизводительного секвенирования ПЦР фрагментов гена 16S рРНК был определен состав микробного сообщества отходов. Единственной группой, для которой известна способность к диссимиляционной сульфатредукции, обнаруженной в метагеноме, являлись представители рода *Desulfovibrio*. Однако их доля в сообществе не превышала 0.1%. Эксперименты с моделированием влияния различных соединений, проведенные в изолированных микрокосмах, показали, что фактором, лимитирующим численность *Desulfovibrio*, является отсутствие доступных низкомолекулярных органических субстратов. Внесение дополнительно лактата с сульфатом увеличивало долю *Desulfovibrio* до 2% в сообществе, в то время, как внесение сульфата без лактата не изменяло численности. При этом, эксперименты с добавлением сульфата показали увеличение скорости СР до 0.32  $\text{ммоль/л/сутки}$  при одновременном внесении сульфата и лактата скорость увеличивалась до 0.51  $\text{ммоль/л/сутки}$ .

Информация о составе сообщества, полученная молекулярными методами, была использована для разработки стратегии выделения чистых культур *Desulfovibrio* из проб отходов. Была использована среда Видделя-Бака с добавлением формиата в качестве донора электронов. Большинство *Desulfovibrio* могут расти автотрофно с формиатом, одновременно такая среда снижает вероятность конкуренции СРБ с другими гетеротрофами, использующими лактат или другие низкомолекулярные органические кислоты. Для получения первоначальных накопительных культур использовали твердую среду, что позволило быстро отобрать сульфидогенные организмы по черному цвету колоний, связанному с образованием осадка сульфида железа. В результате были выделены две чистых культуры СРБ, обозначенные L1 и L2. Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штаммы, представляли виды *Desulfovibrio vulgaris* и *Desulfovibrio desulfuricans*. Ближайшим родственником *D. vulgaris* L1 является модельный штамм СРБ *D. vulgaris* Hildenborough со сходством последовательностей 99.78%. Последовательность гена 16S рРНК штамма *D. desulfuricans* L2 совпадала с другим классическим сульфатредуктором, *D. desulfuricans* Essex 6, на 100%.

Эксперименты с микрокосмами показали, что присутствующие в отходах *Desulfovibrio* не были лимитированы сульфатом, но, вероятно, конкурировали с другими гетеротрофами за низкомолекулярные органические кислоты, являющихся донорами электронов для сульфатредукции. Измеренная концентрация сульфата в отходах, отобранных непосредственно в месте стока отходов свинокмплекса в пруды-накопители, составляла 192  $\text{мг/л}$ , что представляет значительную величину, сравнимую, например, с отходами угольной промышленности. Концентрация сульфата в пруду-накопителе была ниже – 42  $\text{мг/л}$ , что может свидетельствовать о частичном расходе на сульфатредукцию. Источником сульфата в свином навозе могут быть различные добавки, применяемые в животноводстве. Например, известны случаи добавления в навоз сульфата аммония в качестве источника азота на стадии переработки. Снижение концентрации сульфата в

сельскохозяйственном производстве может рассматриваться как превентивная мера для снижения концентрации образующегося сероводорода и борьбы с неприятным запахом отходов.

*Исследование поддержано грантом РФФИ 18-29-25041.*

## **Биоконверсия холестерина в прогестерон рекомбинантными штаммами *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 с делециями в генах окисления стероидного ядра**

***Карпов М.В., Стрижов Н.И., Шутов А.А., Донова М.В.***

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
г. Пушкино; mikemikekarp@mail.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_200-201

Прогестерон – эндогенный стероидный гормон млекопитающих, способствующий возникновению и протеканию беременности. Он является ключевым предшественником стероидных гормонов (прогестагенов, минерало- и глюкокортикоидов, андрогенов и эстрогенов), а также выполняет роль нейростероида. У позвоночных животных прогестерон синтезируется из прегненолона в результате реакции, катализируемой 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназой. В свою очередь, процесс биосинтеза прегненолона из холестерина происходит под действием трёхкомпонентной холестерингидроксилазной/С20-С22-лиазной ферментной системы (ХГС) с цитохромом P450<sub>ssc</sub> в качестве терминальной оксидазы. Принципиально новые решения в области стероидной биотехнологии основаны на создании генно-инженерных микроорганизмов для получения фармацевтически важных стероидных субстанций. Ранее была показана возможность гетерологической экспрессии генов компонентов ХГС быка в клетках непатогенного быстрорастущего штамма *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, который имеет собственную систему превращения стероидов и обладает промышленным потенциалом в качестве продуцента стероидных соединений. Полученный рекомбинантный микобактериальный штамм осуществлял направленную трансформацию холестерина в прогестерон [1]. При этом в процессе роста наблюдалась деструкция как субстрата биоконверсии, так и накопленного продукта, что связано с активностью собственных ферментов стероидного катаболизма хозяйского штамма.

Целью работы явилось создание рекомбинантных штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, несущих делеционные мутации в генах ферментов окисления стероидного ядра и гетерологически ко-экспрессирующих гены компонентов холестерингидроксилазной/С20-С22-лиазной ферментной системы бычьей коры надпочечников.

Проблема, связанная с сохранением 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен структуры холестерина, была частично решена с использованием мутантного штамма *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155  $\Delta$ hsdD, несущего делецию в гене MSMEG\_5228, кодирующего 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназу. Известно, что данный фермент имеет преимущественную роль в окислении холестерина до холестенона, который не является субстратом для бычьего цитохрома P450<sub>ssc</sub>. Используя гомологическую рекомбинацию как метод для получения безмаркерных мутантов, были введены делеции в гены *M. smegmatis*  $\Delta$ hsdD, кодирующие ключевые ферменты катаболизма стероидов: 3-кетостероид-9 $\alpha$ -гидроксилазы, KshAB (ген MSMEG\_6039\_kshB) и 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы, KstD (ген MSMEG\_5941\_kstD). Результаты мутагенеза подтверждены ПЦР скринингом. Полученные мутанты ожидаемо накапливали соответствующие стероидные продукты из стероидов ( $\Delta$ hsdD $\Delta$ kshB –

андростадиендион, *ΔhsdΔkstD* – 9α-ОН-андростендион, *ΔhsdΔkshBΔkstD* – андростендион), а внесённые делеции не оказывали достоверного влияния на их ростовые характеристики.

В компетентные клетки *M. smegmatis ΔhsdΔkshB*, *M. smegmatis ΔhsdΔkstD* и *M. smegmatis ΔhsdΔkshBΔkstD* были перенесены плазмидные генетические конструкции pNS11, позволяющие ко-экспрессировать гены компонентов ХГС: цитохрома P450<sub>sc</sub>, адренодоксина (Adx) и адренодоксинредуктазы (AdR).

В качестве субстрата биоконверсии использовали холестерин с нагрузкой 3 г/л, который вносили в виде растворимого комплекса с солюбилизатором метил-β-циклодекстрином через 36 часов индукции синтеза гетерологичных белков. Процесс получения прогестерона с использованием полученных штаммов включал два последовательных этапа. На первом этапе рекомбинантная ХГС катализировала отщепление боковой цепи холестерина с образованием ключевого интермедиата – прегненолона. На втором этапе происходило его окисление до прогестерона под действием собственных микобактериальных ферментов. Установлено, что в процессе биоконверсии холестерина штаммом *M. smegmatis ΔhsdΔkshB* (pNS11) наблюдается окисление накопленного прогестерона с образованием его 1(2)-дегидрированного аналога, что связано с активностью микобактериальной 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы KstD. Напротив, с использованием *M. smegmatis ΔhsdΔkstD* (pNS11) и *M. smegmatis ΔhsdΔkshBΔkstD* (pNS11), несущих делецию данного гена, достоверной деструкции продукта обнаружено не было. Максимальный выход прогестерона 281 мг/л при биоконверсии 3 г/л холестерина (11,5% моль/моль) был достигнут при использовании культуры рекомбинантного штамма *M. smegmatis ΔhsdΔkshBΔkstD* (pNS11).

Результаты исследований могут быть использованы при создании одностадийного микробиологического способа получения терапевтических C21-стероидов из холестерина.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект РНФ 18-14-00361).*

## Литература

1. Strizhov N., Fokina V., Sukhodolskaya G., Dovbnya D., Karpov M., Shutov A., Novikova L., Donova M.. Progesterone biosynthesis by combined action of adrenal steroidogenic and mycobacterial enzymes in fast growing mycobacteria // *New Biotechnology*. 2014. V. 31. P. 67.

## **Стабильность алкогольоксидазного биосенсора, модифицированного терморасширенным графитом**

***Китова А.Е., Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н.***

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
kitova@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_201-203

Электроды, полученные методом матричной печати (МП), модифицированные различными наноматериалами, часто используются при создании биосенсоров [1, 2]. Модификация наноматериалами позволяет увеличить эффективную площадь поверхности и за счет этого повысить чувствительность электродов, а также уменьшить внутреннее сопротивление измерительных электродов [3]. Графеноподобный материал - терморасширенный графит (ТРГ) обладает высокой электропроводностью, большой

удельной поверхностью, химической стойкостью и биосовместимостью [4]. Ранее было показано, что модификация ТРГ печатных электродов, содержащих иммобилизованные бактерии *Gluconobacter oxydans* или глюкозооксидазу позволяет существенно улучшить их характеристики - амплитуду сигнала и чувствительность сенсора к глюкозе и этиловому спирту [5], что связано с уменьшением внутреннего сопротивления измерительных электродов [3].

Использование берлинской лазури в качестве медиатора электронного транспорта при создании биосенсоров позволяет детектировать пероксид водорода, образующийся в результате ферментативной реакции, при низком прикладываемом потенциале. Такие биосенсоры обладают высокой чувствительностью и селективностью [6]. При создании биосенсора важен также выбор метода иммобилизации биоматериала. В последнее время часто используется включение в гель хитозана [7]. Хитозан является природным полисахаридом, который обладает такими свойствами как хорошая адгезия, высокая гидрофильность, механическая прочность и невысокая стоимость [8].

В данной работе исследованы параметры электродов, полученных методом матричной печати, модифицированных берлинской лазурью, ТРГ и алкогольоксидазой.

Исследованы калибровочные зависимости АО-биосенсоров. Для АО-биосенсора без нанесения ТРГ линейный диапазон детекции составлял 0.1 – 2.0 мМ, при этом чувствительность в области линейного диапазона соответствовала 0.35 мкА/мМ. Для АО-биосенсора, модифицированного ТРГ, линейный диапазон детекции находился также в пределах от 0.1 до 2.0 мМ. При этом, чувствительность в области линейного диапазона составляла 2.43 мкА/мМ, что в 7 раз выше аналогичного параметра немодифицированного ТРГ АО-биосенсора.

Стабильность в течение 10 дней измерений представлена на рис. 1. Амплитуда сигнала немодифицированного ТРГ АО-биосенсора (кривая 1) снижалась в 2 раза на второй день измерений. На 10-й день измерений амплитуда сигнала снижалась на 70% по сравнению с начальным уровнем сигнала. АО-биосенсор, модифицированный ТРГ (кривая 2) отличался в 5 раз большей амплитудой сигнала и к концу периода измерений величина сигнала снижалась на 40% по сравнению с исходным значением.

Стабильность при хранении при +4°C в течении 45 дней представлена на рис. 2. При хранении в течение 15 дней параметры АО-ТРГ-биосенсора не изменялись существенно. На 45-й день хранения линейный диапазон уменьшился вдвое, при этом чувствительность биосенсора в области линейного диапазона не изменилась.

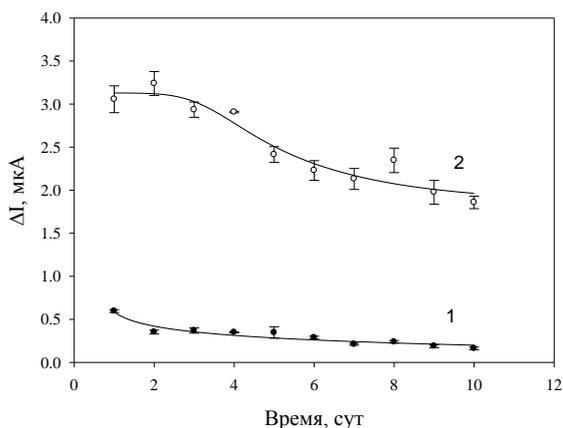


Рис. 1. Стабильность АО-биосенсоров в течение 10 дней измерений (кривая 1 – АО-биосенсор, кривая 2 – АО-ТРГ-биосенсор).

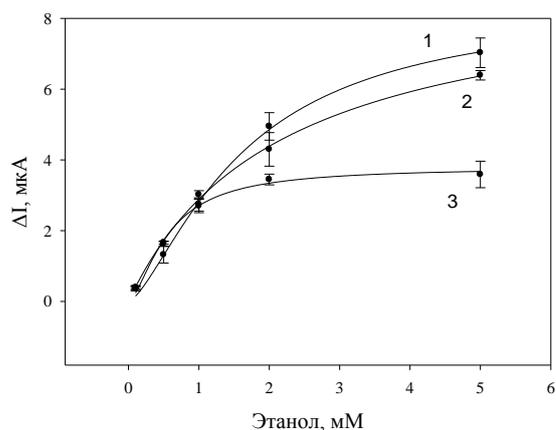


Рис. 2. Калибровочные зависимости АО-ТРГ-биосенсора при хранении (кривая 1 – первый день измерений, кривая 2 – 15-й день хранения, кривая 3 – 45-й день хранения).

Таким образом, модификация измерительного электрода ТРГ приводит к росту значений регистрируемых токов, а также позволяет существенно повысить чувствительность биосенсора. Исследована долговременная стабильность АО-ТРГ-биосенсора. Показано, что, иммобилизация ферментов в геле хитозана на подложке из ТРГ позволяет сохранять стабильность биосенсоров в течение 45 дней.

#### Литература

1. Nicholas P., Pittson R., Hart J. P. Development of a simple, low cost chronoamperometric assay for fructose based on a commercial graphite-nanoparticle modified screen-printed carbon electrode // *Food Chemistry*. 2018. V.241. P. 122–126.
2. Arduini F., Micheli L., Moscone D., Palleschi G., Piermarini S., Ricci F., Volpe G. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. V. 79. P. 114–126.
3. Решетилов А.Н., Китова А.Е., Мачулин А.В., Тарасов С.Е., Гуторов М.А., Алферов С.В., Колесов В.В., Готовцев П.М., Василев Р.Г. Биосенсор на основе клеток *Glucanobacter* и терморасширенного графита // *Сенсорные системы*. 2016. Т. 30. № 4. С. 351-354
4. Горшенев В.Н., Илюшин А.С., Колесов В.В., Фионов А.С., Петрова Н.Г. Композиционные материалы на основе терморасширенного графита // *Перспективные материалы*. 2008. Вып. 6. Ч. 1. С. 351-355.
5. Китова А.Е., Плеханова Ю.В., Колесов В.В., Решетилов А.Н. Глюкозооксидазный биосенсор на основе печатного электрода, модифицированного терморасширенным графитом // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2018. № 2. С. 34-40.
6. Cinti S., Cusenza R., Moscone D., Arduini F. Paper-based synthesis of Prussian Blue Nanoparticles for the development of whole blood glucose electrochemical biosensor // *Talanta*. 2018. V. 187. P. 59–64.
7. Le T. X. H., Flaud V., Bechelany M., Cretin M., Tingry S. Optimal direct electron transfer between MWCNTsCOOH/BOD/chitosan layer and porous carbon felt for dioxygen reduction // *Electrochimica Acta*. 2017. V. 230. P. 373–381.
8. Wang X., Gu H., Yin F., Tu Y. A glucose biosensor based on Prussian blue/chitosan hybrid film // *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. V. 24. № 5. P. 1527-1530.

### **Новые активные грибные биокатализаторы трансформации андрост-4-ен-3,17-диона и андроста-1,4-диен-3,17-диона**

<sup>1</sup>Коллеров В.В., <sup>1</sup>Шутов А.А., <sup>2</sup>Казанцев А.В., <sup>1</sup>Донова М.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
svkollerov@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_203-205

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Микробиологическое окисление и деградация боковой цепи фитостероидов, эффективно катализируемое различными бактериальными штаммами, является хорошо устоявшимся методом производства так называемых первичных стероидов андростанового ряда: андрост-4-ен-3,17-диона (АД) и андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) (1). Однако, для получения соединений, обладающих биологической активностью необходима дальнейшая структурная модификация 3-оксостероидов андростанового ряда,

требующая различных реакций, в первую очередь, регио- и стереоспецифического гидроксирования, крайне сложного к осуществлению с использованием традиционного химического синтеза. Лекарственные препараты на основе 11- и 14-гидроксированных производных широко используются в терапии многих заболеваний, связанных с воспалительными и аллергическими процессами,  $7\alpha/\beta$ -гидроксипроизводные АД и АДД могут служить ключевыми предшественниками в комбинированном химико-микробиологическом синтезе ценных желчных кислот из неживотных источников (2,3).

Среди большого разнообразия микроорганизмов, способных катализировать структурную модификацию стероидов, мицелиальные грибы представляют особый интерес, так как являются источником уникальных монооксигеназ и оксидоредуктаз, позволяющих осуществлять устойчивый и экологичный синтез ценных гидроксистероидов (4). Тем не менее, биокаталитический потенциал большей части микромицетов остается практически неизученным в отношении 3-оксостероидов андростанового ряда.

Целью настоящего исследования являлось изучение трансформационной активности мицелиальных грибов (ранее не исследованных для этих целей) в отношении АД и АДД с выделением и идентификацией основных продуктов трансформации и установлением метаболических путей конверсии стероидных субстратов в клетках наиболее активных грибных культур.

В ходе проведения работы, 45 предварительно отобранных грибных штаммов из отделов *Ascomycota* и *Zygomycota* были протестированы в отношении двух стероидных субстратов: АД и его 1(2)-дегидропроизводного, АДД. За исключением шести представителей родов *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Sordaria* и *Conidiobolus*, не способных к структурной модификации АД и АДД в заданных условиях и четырех штаммов *Acremonium domschii*, *Chaetomidium pilosum*, *Thielavia ovispora* и *Phycomyces blakesleeanus*, проявляющих биокаталитическую активность только в отношении АДД с накоплением метаболитов не идентифицированной структуры (из-за их малого количества и низкой селективности образования), остальные 35 штаммов активно трансформировали АД и АДД.

С использованием методов экстракции и колоночной хроматографии были выделены и очищены все основные продукты и интермедиаты биоконверсии стероидных субстратов активными грибными культурами и структуры соединений были идентифицированы с использованием ряда аналитических методов: ТСХ, ВЭЖХ, МС,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии. Среди метаболитов с установленной структурой были выявлены продукты гидроксирования по положению  $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $11\alpha$  и  $14\alpha$ ,  $17\beta$  - и 1,2-восстановленные производные, а также продукты реакции 1,2-дегидрирования.

Способность к образованию  $7\alpha$ -гидроксированных производных АД и АДД была показана для 12 представителей семейств *Mucoraceae*, *Hypocreaceae*, *Cunninghamellaceae* и *Pleosporaceae*. Максимальное проявление  $7\alpha$ -гидроксисилазной активности в отношении АД с накоплением свыше 25%  $7\alpha$ -ОН-АД отмечалось для культуры *Absidia coerulea*. Реакцию  $7\beta$ -гидроксирования в отношении АД или АДД катализировали семь штаммов, преимущественно аскомицетов, относящихся к родам *Acremonium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Absidia* и *Cunninghamella*. Наиболее активными биокатализаторами данной реакции являлись грибные культуры *Drechslera* sp. и *Gibberella zeae*, способные к накоплению свыше 40%  $7\beta$ -гидроксипроизводных.

Проявление  $11\alpha$ -гидроксисилазной активности в отношении исследуемых 3-оксостероидов андростанового ряда было отмечено для 9 представителей родов *Acremonium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Beauveria*, *Absidia*, *Cunninghamella* и *Mortierella*, а штамм *Beauveria bassiana* был отобран как наиболее активный биокатализатор  $11\alpha$ -гидроксирования с накоплением до 50%  $11\alpha$ -ОН-АД из АД. Примечательно, что наличие C1-C2 двойной связи в структуре молекулы АДД затрудняло введение гидроксильной группы в положение  $11\alpha$  исследуемым штаммом с выходом  $11\alpha$ -ОН-АДД менее 30%.

14 $\alpha$ -Гидроксилирование АД было характерно для шести представителей родов *Drechslera*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Absidia* и *Cunninghamella* с максимальным проявлением 14 $\alpha$ -гидроксилазной активности штаммом *Drechslera* sp. Следует отметить, что ни один из 45 протестированных штаммов микромицетов не обладал способностью катализировать введение гидроксильной группы в положение 14 $\alpha$  молекулы АДД, указывая на то, что наличие С1-С2 двойной связи в структуре молекулы стероидного субстрата, по-видимому, препятствует введению гидроксильной группы в положение С14.

Помимо реакций гидроксилирования, для некоторых грибных штаммов, в частности, *Drechslera* sp., *Acremonium cereales*, *Doratomyces purpureofuscus* и *Fusarium merismoides* было характерно проявление 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназной активности (17 $\beta$ -ГСД) с возможностью накопления из АД и АДД тестостерона и дегидротестостерона, соответственно. Наибольшее проявление 17 $\beta$ -ГСД активности наблюдалось для клеток мицелия *Drechslera* sp. при инкубировании с АД, однако, реакция восстановления 17-кето группы сопровождалась активным 7 $\alpha$ -гидроксилированием с накоплением 7 $\alpha$ -ОН-тестостерона в качестве основного продукта биоконверсии (до 40%).

Таким образом, в ходе проведения работы были выявлены новые перспективные биокатализаторы 7 $\alpha$ / $\beta$ -, 11 $\alpha$ - и 14 $\alpha$ -гидроксилирования, а также 17-кето восстановления стероидов андростанового ряда. Полученные данные расширяют представления о биоразнообразии стероид-трансформирующих мицелиальных грибов, дополняют сведения о влиянии структуры стероидного субстрата на позицию гидроксилирования и свидетельствуют о высоком потенциале выявленных грибных биокатализаторов в синтезе ключевых интермедиатов ценных лекарственных форм.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 18-14-00361).

#### Литература

1. Donova, M.V., Egorova, O.V. 2012. Microbial steroid transformations: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 94, 1423–1447.
2. Bolten, S.L., Clayton, R.A., Easton, A.M., Engel, L.C., Messing, D.M., Reitz, B., Walker, M.C., Wang, T. 2007. *Aspergillus ochraceus* 11 $\alpha$ -hydroxylase and oxidoreductase. US Patent 7238507 B2.
3. Wang, Y., Yue, Q., Zhao, Y., Qiu, S., Peng, Y., Li, J., Zhang, T., Hai, L., Guo, L., Wu, Y. 2016. First synthesis of 22-oxa-chenodeoxycholic acid analogue. Steroids. 110, 70–76.
4. Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M.A. 2015. Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatal Biotransformation. 33, 1–28.

#### Характеристика микроорганизмов с фенолдеградирующими свойствами

<sup>1</sup>Кувичкина Т.Н., <sup>2</sup>Носулич В.Е., <sup>1</sup>Капарулина Е.Н., <sup>1</sup>Доронина Н.В.,  
<sup>3</sup>Макаренко А.А., <sup>1</sup>Решетиллов А.Н.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

<sup>2</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, г. Самара,

<sup>3</sup>ООО Эмульсионные технологии, г. Самара; DOI: 10.18334/ibpm2019\_205-206

Наиболее перспективным методом утилизации фенола из загрязненных почв является биоремедиация с помощью микроорганизмов, что обуславливает актуальность проблемы поиска новых фенолдеградирующих микроорганизмов. Из почвы

промышленной зоны г. Самара выделены 2 штамма *Zima* и *Leto* - деструкторы фенола. Цель данной работы – характеристика новых грамположительных штаммов-деструкторов фенола и исследование их окисления на амперометрическом биосенсоре. Микроскопия штамма *Zima* показала, что он представляет собой палочковидные клетки диаметром от 2,5 до 4,0 мкм. Видовую принадлежность штаммов определяли по результатам исследования основных морфологических признаков, а также изучения их филогенетического положения согласно особенностям строения последовательности гена 16S рРНК. По данным, помещенным в базу данных GenBank, было построено филогенетическое дерево для штамма *Zima*. Филогенетически штамм *Zima* имеет наибольшее сходство с представителями рода *Pseudomonas*: 99,9% с *P. monteilii*. Изолят *Leto* представлен грамположительными неподвижными короткими овоидными палочками. Оптимально растет при 28-37 °С и рН 7.5 с 0.25 г/л (2,7 мМ) фенола в качестве единственного источника углерода и энергии, а также на широком спектре полиуглеродных субстратов (углеводы, спирты и органические кислоты). Секвенирование гена 16S рРНК штамма *Leto* выявило высокое сходство (99,7%) с *Rhodococcus gordoniae* W4937T, что дало основание отнести изолят к этому виду.

Микроорганизм выращивали при глубинном культивировании в периодических условиях в колбах на качалке. Выраченную биомассу отделяли центрифугированием, ресуспендировали в буфере и помещали на носитель (иммобилизация методом физической адсорбции), подсушивали и сопрягали биорецептор с кислородным электродом типа Кларка. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала  $dI/dt$  (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода.

Для изучения влияния концентраций фенола на потребление кислорода иммобилизованными клетками концентрации субстрата варьировали от 10 до 500 мкМ. Исследуя субстратную специфичность, показано, что большой ответ наблюдался при введении в кювету пирокатехина (катехола), промежуточного соединения при окислении фенола. Долговременная стабильность наблюдалась в течение 9 суток. Продолжительность анализа была 10 мин.

## **Новый метод выделения из мицелия *Mortierella alpina* смеси эфиров жирных кислот с высоким содержанием арахидоновой кислоты**

*Миронов А.А., Моргунов И.Г.*

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; asolfr@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_206-207

Классическим методом выделения липидов из биомассы микроорганизмов является метод Фолча [1], который заключается в экстракции липидов из биомассы смесью хлороформ-метанол (2:1) с последующим гидролизом липидов и метилированием жирных кислот. Этот метод довольно трудоемок, требует предварительного разрушения клеток механической гомогенизацией или обработки ультразвуком и используется в основном при исследовании фракционного состава липидов.

Для анализа жирно-кислотного состава липидов разработаны методы прямой этерификации биомассы с выделением смеси метиловых (или этиловых) эфиров жирных кислот. В частности, был предложен экспресс-метод выделения метиловых эфиров жирных кислот с использованием ацетилхлорида [2]. Этот метод действительно очень точен, прост и нетрудоемок; однако, в связи с тем, что ацетилхлорид в 2010 г. был

включен в РФ в список прекурсоров, мы были вынуждены разработать новый метод метанолиза, применительно к нашим образцам биомассы, обеспечивающий получение смеси метиловых эфиров жирных кислот с высоким содержанием арахидоновой кислоты (АК).

Из литературных источников известен метод экстракции липидов из биомассы с использованием смеси метанол-хлористоводородная кислота-хлороформ (10:1:1, об./об.) и последующей прямой трансэтерификацией в течении 60 или 120 мин [3].

В ходе выполнения работы были изучены следующие параметры метанолиза: состав реакционной смеси, время, температура и способ гидролиза (нагревание на водяной бане с обратным холодильником или выпаривание на песочной бане). Эксперименты проводили на образцах лиофилизированной биомассы *Mortierella alpina* LPM-301 определенного состава. Для контроля использовали экспресс-метод выделения метиловых эфиров жирных кислот с использованием ацетилхлорида [2]. Полученные результаты показали, что наибольшая экстракция липидов с высоким содержанием АК получена при обработке лиофилизированной биомассы *M. alpina* смесью, содержащей 10% HCl в метаноле и 10% хлороформа с последующим нагреванием на водяной бане с обратным холодильником при 80 °С в течение 3 ч. Внесение гексана в реакционную смесь отрицательно сказывалось на экстракции липидов и АК.

#### Литература

1. Folch et al. *J Biol Chem*, 1957;226(1):497–509.
2. Султанович и др. *Патент 968072 СССР*, 1982 г.
3. Lewis et al. *J Microbiol Methods*, 2000, 43(2):107-116.

### **Эффект изолимонной кислоты в модели обучения и памяти у крыс, подвергшихся нейротоксическому воздействию свинца и молибдена**

<sup>1</sup>Моргунов И.Г., <sup>1</sup>Камзолова С.В., <sup>2</sup>Карпухина О.В., <sup>3</sup>Бокиева С.В., <sup>2</sup>Иноземцев А.Н.

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пущинский Научный центр биологических исследований РАН, г. Пущино; morgunovs@rambler.ru

<sup>2</sup>МГУ им. Ломоносова, биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности, г. Москва, DOI: 10.18334/ibpm2019\_207-209

<sup>3</sup>Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, г. Владикавказ

В последние годы обсуждаются перспективы применения (2*R*,3*S*)-изолимонной кислоты (ИЛК), произведенной с помощью микробного синтеза. Развивается направление об использовании ИЛК в виде лактонов с хиральными свойствами, перспективными для синтеза соединений с противораковой активностью [1]. Триметилизоцитрат рассматривается в качестве средств лечения болезни Паркинсона [2]. Мы разработали технологию получения препарата монокалийной соли ИЛК, который является эффективным протектором от воздействия тяжелых металлов у одноклеточных организмов и по своему положительному действию превосходит классический антиоксидант – аскорбиновую кислоту [3]. Продолжение изучения антиоксидантных свойств ИЛК при интоксикации тяжелыми металлами актуально в связи с тем, что их широкое распространение в окружающей среде вызывает различные патологии, в том числе, расстройства высших психических функций, такие как обучение и память [4].

Целью настоящей работы было испытание препарата ИЛК в модели обучения и памяти у крыс, подвергшихся нейротоксическому воздействию тяжелых металлов.

Наработка препарата монокалиевой соли ИЛК проводилась по ранее разработанному способу [3]. Тестирование препарата ИЛК проводилось с белыми беспородными крысами-самцами. Крысам группы № 1 вводили ИЛК (20 мг/кг); групп № 2 и № 3 - водные растворы диацетата свинца ( $10^{-7}$  М) и молибдата аммония ( $10^{-5}$  М), соответственно; групп № 5 и № 6 – ИЛК в комбинации с солями свинца и молибдена, соответственно. Животные группы № 6 – интактные крысы, получавшие стерильную дистиллированную воду за 1 час до начала опытов с животными других групп. Соли тяжелых металлов вводили внутривентриально по 2 мл за 5 ч до начала опытов, ИЛК – через 4 ч после введения растворов солей тяжелых металлов. У животных в течение 5 опытов (по 25 предъявлений раздражителей в каждом) вырабатывали условную реакцию активного избегания (УРАИ), служащую экспериментальной моделью обучения и памяти [5]. Опыты проводили в челночной камере (60x30x30 см), разделенной перегородкой с отверстием на 2 равные половины. Опыт протекал по следующей схеме: включали звуковой условный раздражитель и через 10 с подавали ток (0,5-0,7 мА) в проводку пола той половины камеры, в которой находилась крыса. Переход животного на другую половину камеры выключал оба стимула. При отсутствии перехода раздражители выключали через 10 с от момента включения тока. Через 30 с раздражители предъявлялись повторно. Условной реакцией активного избегания считали переход крысы на другую половину камеры в ответ на условный стимул. Величину УРАИ оценивали числом правильных реакций в процентах от числа предъявлений стимулов.

Полученные экспериментальные данные приведены в таблице. Под воздействием ИЛК обучение в первые 2 дня проходило быстрее, чем у контрольных крыс, а в остальные дни показатели обучения были сопоставимы с контрольными. Такое избирательное влияние, по-видимому, связано с тем, что в начальный период животные больше всего подвергаются воздействию тока, вызывающего электрошолевой стресс.

Табл. Влияние ИЛК и солей тяжелых металлов на УРАИ

Группа	Вещество	Опытные дни				
		1	2	3	4	5
1	Контроль (H <sub>2</sub> O)	8,8 ± 9,2	28 ± 12,9	54,0 ± 9,7	66,0 ± 12,7	84,0 ± 7,1
2	ИЛК	30,0 ± 11,0*	42,4 ± 10,5*	55,2 ± 11,9	69,6 ± 8,7	80,4 ± 9,5
3	Pb	8,4 ± 14,8	13,6 ± 13,2*	21,6 ± 13,2*	20,0 ± 15,3*	16,8 ± 10,8*
4	Mo	9,6 ± 15,1*	32,4 ± 7,9	40,4 ± 10,0*	57,1 ± 16,1*	68,4 ± 11,5*
5	ИЛК + Pb	11,6 ± 7,2#	35,6 ± 12,9!	46,4 ± 17,3!	63,2 ± 11,8!	78,4 ± 7,1!
6	ИЛК + Mo	36,8 ± 13,6*	54,0 ± 8,1*!	71,2 ± 6,7*!##	78,4 ± 3,4!#	83,6 ± 9,3!

Данные представлены в виде средней и стандартного отклонения. \* означает  $p < 0,05$  относительно контроля; ! \* -  $p < 0,05$  относительно тяжелых металлов; ## -  $p < 0,05$  относительно ИЛК.

Так, например, у контрольных крыс в первый день реакций избеганий было меньше 10% (т.е. они в среднем подвергались как минимум 9 ударам тока из каждых 10-ти возможных). Ранее было показано, что выработка УРАИ вызывает помимо электрошолевого стресса, и окислительный стресс, при этом антиоксидант карнозин подавляет его и ускоряет обучение [6]. Следовательно, указанное в нашей работе усиление стресса составляет точку приложения для антиоксидантов, что обеспечивает большую возможность для проявления антиоксидантной активности ИЛК. Начиная с 3-его дня число УРАИ увеличивается, а число

ударов тока уменьшается, и эффект ИЛК нивелируется. Тяжелые металлы угнетали обучение, хотя и в разной степени. Более сильное угнетающее действие оказал свинец; при его введении животные даже в последний день обучения в среднем получали более 20 ударов тока из 25 возможных. Применение дисперсионного анализа Краскала-Уоллиса показало, что при воздействии диацетата свинца статистически значимого увеличения количества УРАИ, начиная со 2-го опытного дня, не происходило, что свидетельствует о глубоком угнетении обучения и памяти. Эти данные согласуются с ранее полученными [4], что подтверждает хорошую воспроизводимость результатов угнетающего эффекта этого тяжелого металла. В то же время молибден оказывал незначительное угнетение на обучение животных, его применение вызывало статистически значимое уменьшение числа УРАИ относительно контроля только в последние три опытных дня, а в 1-й день, напротив, молибден ускорил обучение. ИЛК противодействует нейротоксической атаке тяжелых металлов на обучение и память. Это видно из того, что число УРАИ при её совместном применении с солями как свинца, так и молибдена превышало таковое при отдельном применении данных солей тяжелых металлов. При этом соль свинца в 1-й опытный день ослабила положительное влияние ИЛК на обучение и память крыс. Следует отметить результаты совместного применения ИЛК с молибдатом аммония: выработка УРАИ при сочетанном воздействии ИЛК и молибдата аммония не только выше выработки УРАИ при воздействии молибдена, но и выше контроля, и выше уровня, полученного под воздействием ИЛК. Таким образом, молибден, в отличие от свинца, усиливает нейропротекторное действие ИЛК.

Таким образом, можно заключить, что ИЛК противодействует электролевному стрессу, возникающему на начальном этапе выработки УРАИ, и окислительному стрессу, провоцируемому ацетатом свинца и молибдатом аммония.

#### Литература

1. Aurich et al. In: Wang, X., Chen, J., Quinn, P. (Eds.), *Reprogramming microbial metabolic pathways*. Springer, Dordrecht, 2012, pp. 391–424.
2. Yang et al. *PLoS Genet* 2017, 13(8):e1006975.
3. Morgunov et al. *Prep Biochem Biotechnol* 2018, 48(1):1-5.
4. Иноземцев и др. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология, 2017, 72(3):174-178.
5. Bures et al. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. 2-nd ed. Amsterdam, Elsevier, 1983, 398 p.
6. Бережной и др. *Нейрохимия* 2016, 33(4): 293-300.

### **Биоэлектрохимические свойства проводящих матриц «фермент/полиэлектролиты/многостенные углеродные нанотрубки»**

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пущино; plekhanova@ibpm.pushchino.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_209-211

Одной из задач биотехнологии является эффективная и надежная иммобилизация ферментов на твердых подложках. Для сохранения активности ферментов на высоком уровне в течение длительного времени может использоваться метод капсулирования. Мультислойная мембрана оказывает защищающее действие на объекты, находящиеся внутри капсулы, что позволяет использовать их в качестве микроконтейнеров и

микрореакторов в фармацевтической, косметической, пищевой, текстильной и сельскохозяйственной промышленности. Капсулы, содержащие ферменты, могут быть использованы для создания биосенсоров и биотопливных элементов. Модификация капсул наноматериалами, например, многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) будет приводить к изменению их электрохимических свойств.

Целью данной работы являлось исследование изменений биоэлектрохимических свойств мультислойных полиэлектролитных проводящих матриц в виде микрокапсул, содержащих фермент, при модификации их многостенными углеродными нанотрубками. Как модельный объект использовали глюкозооксидазу (ГОД) и мембранные фракции (МФ) клеток *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280.

Измерения выполняли на 3-контактных электродах, полученных матричной печатью (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия). Использовали глюкозооксидазу из *Aspergillus niger*, с активностью 185000 U/г/. Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК) с ферментом иммобилизовали сорбцией на поверхности графитового электрода. Концентрация фермента на поверхности электрода составляла 139 мкг/см<sup>2</sup>. Между измерениями готовые биосенсоры хранили при температуре 4°C в темноте. Измерения выполняли при температуре 200 С в кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании. рН, молярность и концентрацию NaCl в буферном растворе варьировали. Вольтамперометрические и импедансные измерения проводили в присутствии 5 мМ феррицианида калия. Проводили сравнение свойств проводящих матриц, модифицированных и не модифицированных углеродными нанотрубками и ферментом.

Внешний вид проводящих матриц, содержащих фермент, был изучен с помощью методов атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии. Было показано, что размер единичной микрокапсулы составлял 2,8±0,5 мкм, при этом капсулы склонны к небольшой конъюгации. Единичная микрокапсула состояла из шести слоев противоположно заряженных полиэлектролитов, каждый из которых был толщиной около 6 нм.

Электрохимические свойства проводящей матрицы исследовали с помощью метода электрохимической импедансной спектроскопии. Состав раствора в измерительной ячейке оставался неизменным, поэтому любые изменения в импедансных спектрах были связаны лишь с модификацией поверхности электрода. Рассматривались импедансные спектры для немодифицированных электродов, а также спектры для электродов, модифицированных различными вариантами полимерных матриц с нанотрубками (ПМК с МУНТ в ядре; ПМК с МУНТ между слоями полиэлектролитов; ПМК с МУНТ и в ядре, и между слоями полиэлектролитов; ПМК, содержащие фермент и МУНТ в ядре). Значения общих сопротивлений для электродов с различными вариантами модификации поверхности представлены в таблице. Стоит отметить, что вид импедансных зависимостей электродов значительно изменялся при добавлении на их поверхность ПМК. Вместо стандартного полукруга на частотной характеристике наблюдалось два полукруга, каждый из которых характеризовался отдельной парой из емкости и сопротивления переноса заряда. Это, скорее всего, связано с появлением дополнительной границы раздела фаз, через которую происходит перенос электронов в системе.

Табл. 1. Сопротивления электродов с различными модификациями поверхности

Графитовый электрод, модифицированный различными компонентами	Сопротивление общее, кОм
немодифицированный	4200±200
ПМК	2560±170

МУНТ	34±1
ПМК/МУНТ в ядре	172±8
ПМК/МУНТ между слоями полиэлектролитов	181±6
ПМК/МУНТ в ядре и между слоями полиэлектролитов	162±6
ГО	1200±30
ПМК с ГО	120±4
ПМК с ГО и МУНТ в ядре и между слоями полиэлектролитов	25±1

Были также исследованы циклические вольтамперметрические характеристики электродов, модифицированных различными вариантами матриц с ПМК. Наиболее значимые изменения вида кривых вольтаммограмм происходят при внесении в матрицу ПМК углеродных нанотрубок.

Верхний слой полиэлектролита, покрывающий капсулу, несет отрицательный заряд и хорошо сорбируется на поверхности графитового электрода благодаря кулоновскому взаимодействию. Для изучения возможного практического применения проводящих матриц на основе ПМК измерительные электроды предварительно модифицировали гексацианоферратом железа (берлинская лазурь) и использовали в качестве биосенсора для измерения глюкозы. Берлинская лазурь является электрокатализатором восстановления пероксида водорода, который выделяется в ходе окисления субстрата ферментом и отражает каталитическую активность иммобилизованного фермента.

Были изучены характеристики биосенсоров на основе электродов с берлинской лазурью, модифицированных полиэлектролитными капсулами с ферментом. Использовали капсулы, содержащие и не содержащие в своем составе МУНТ. Введение в состав капсул МУНТ приводит к более высокой чувствительности биосенсора (0.30 мкА/мМ против 0.05 мкА/мМ) к глюкозе при одинаковой концентрации фермента на электроде. Дополнительная модификация поверхности электрода нанотрубками приводит к еще более высоким сигналам биосенсора и значительному увеличению чувствительности (до 0.94 мкА/мМ) анализа. Такое явление связано с увеличением проводимости системы и возможностью облегченной передачи электронов по нанотрубкам на электрод от фермента через мембрану полиэлектролитных капсул, что подтверждается также импедансометрическими данными. Кроме того, при модификации нанотрубками изменяется диапазон детекции глюкозы. Нижний диапазон детекции смещается до 0.05 мМ с 1 мМ, что позволяет определять более низкие концентрации глюкозы.

Также была изучена возможность встраивания в изученные проводящие матрицы мембранных фракций уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans*, содержащих в своем составе PQQ-зависимые ферменты, в том числе глюкозо- и алкогольдегидрогеназы.

Полученные данные расширяют область применения проводящих матриц «полиэлектролиты/углеродные нанотрубки/биокатализатор» и позволяют предположить перспективность их использования в биосенсорах и биотопливных элементах.

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБФМ РАН Мачулину А.В. за получение микрофотографий СЭМ, а также сотрудникам Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН Тихоненко С. А., Дубровскому А. В., Ким А. Л. за помощь в проведении эксперимента по капсулированию фермента.

## Влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост бактерий-нефтедеструкторов *Rhodococcus sp. S67*

Пронькина Ю.А., Акатова Е.В.

ФГБУО ВО «Тульский государственный университет», г. Тула

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой основную органическую составляющую почвы, воды, твердых горючих ископаемых. ГВ играют важную роль в биосфере: участвуют в образовании структуры почвы, накоплении питательных элементов и микроэлементов в открытой для растений форме, регулировании геохимических потоков металлов в почвенных и водных экосистемах. При систематическом их использовании в качестве микроудобрений в растениеводстве становится лучше структура почвы, ее буферные и ионообменные свойства, проявляют активность почвенные микроорганизмы (Гостищева, 2004), что может оказывать положительных эффект и на процессы биоремедиации нефтезагрязненных территорий под действием микроорганизмов-деструкторов. Однако, есть сведения о том, что гуминовые вещества могут как стимулировать, так и ингибировать рост бактерий-нефтедеструкторов (Тихонов, 2010).

В настоящей работе исследовалось влияние гуминовых веществ различного происхождения на рост бактерий-нефтедеструкторов *Rhodococcus sp. S67*, входящих в биопрепарат «МикроБак», который используют для ликвидации последствий нефтяного загрязнения (Филонов, 2016). Для этого использовали гуминовые вещества, выделенные из различных торфов болот Тульской области: ЧНТ (черноольховый низинный торф), СПТ (сфагновый переходный торф), СВТ (сфагновый верховой торф), ТНТ (тростниковый низинный торф).

Так как большинство месторождений нефти и загрязнённых нефтью территорий расположено в северных регионах, данный биопрепарат могут использовать не только в умеренных температурных условиях, потому подбор ГВ проводили при пониженной температуре. Бактерии *Rhodococcus sp. S67* культивировали при пониженной температуре (10°C) на богатой среде LB (рис. 1) и минеральной среде с добавлением гексадекана (2%) и гуминовых веществ (50 мг/л) (рис. 2). Влияние гуминовых веществ на рост выбранных микроорганизмов оценивали по выходу сырой биомассы после достижения стационарной фазы роста. Биомассу отбирали центрифугированием (рис.1). Контролем служила система, в которой микроорганизмы выращивали без добавления гуминовых веществ.

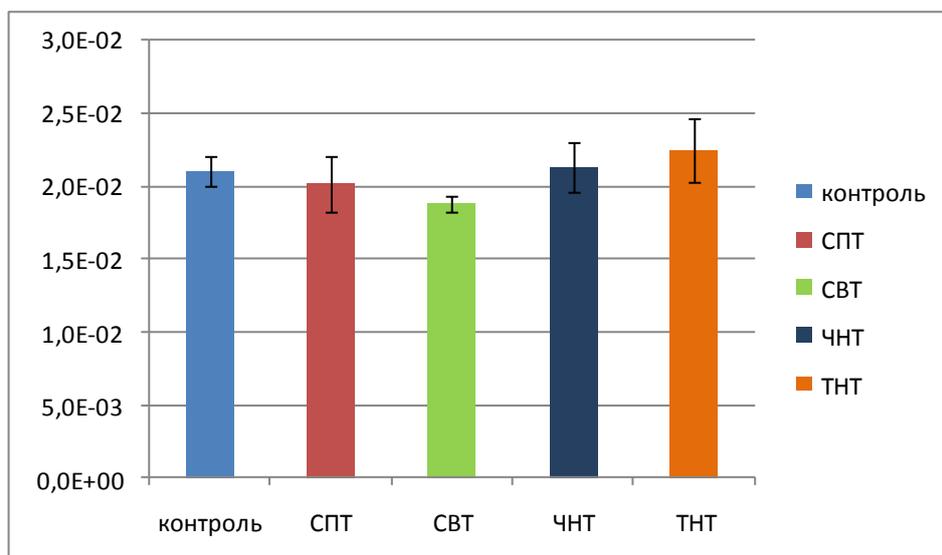


Рис.1. Выход биомассы бактерий *Rhodococcus sp. S67*. Среда LB,  $t = 10^{\circ}\text{C}$ , ЧНТ (черноольховый низинный торф), СПТ (сфагновый переходный торф), СВТ (сфагновый верховой торф), ТНТ (тростниковый низинный торф) – 50 мг/л.

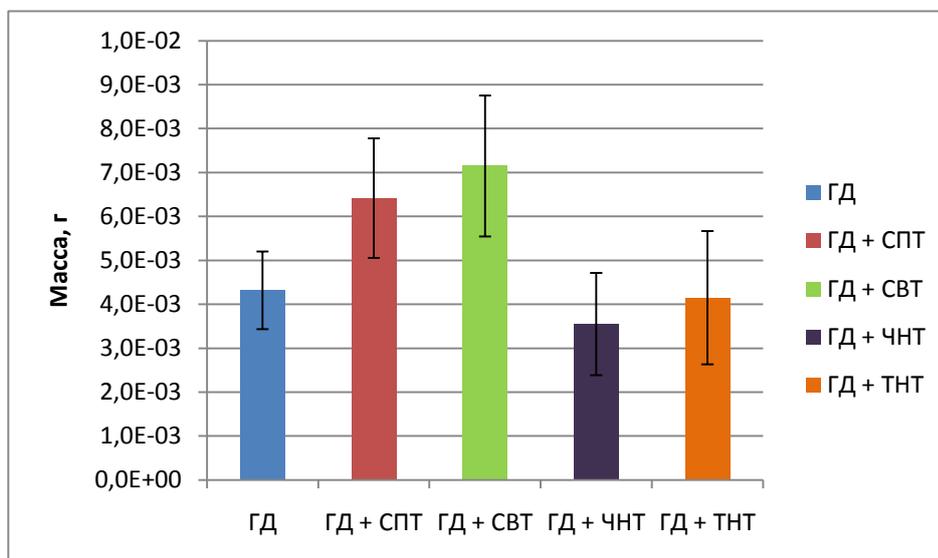


Рис.2. Выход биомассы бактерий *Rhodococcus sp. S67*. Среда Эванса, гексадекан (ГД) – 2%,  $t = 10^{\circ}\text{C}$ , ЧНТ (черноольховый низинный торф), СПТ (сфагновый переходный торф), СВТ (сфагновый верховой торф), ТНТ (тростниковый низинный торф) – 50 мг/л.

Ранее было показано, что в присутствии гуминовых веществ проницаемость клеточных мембран выше, что способствует увеличению поступления в неё азота, фосфора, калия, железа (Горовая, 1995). Однако результаты, полученные нами при пониженной температуре среды, показывают, что при росте бактерий *Rhodococcus sp. S67* на богатой питательной среде гуминовые вещества, независимо от происхождения, не оказывают влияния на выход биомассы. В тоже время в присутствии гексадекана (как источника углерода и энергии) (рис.1), а на минеральной среде Эванса в присутствии гексадекана наблюдается стимуляция роста микроорганизмов при добавлении ГВ сфагнового переходного и верхового торфа. Наиболее вероятный механизм положительного влияния ГВ при пониженных температурах среды, когда гексадекан

находится в твердом агрегатном состоянии, обусловлен увеличением площади поверхности твердого субстрата за счет взаимодействия органическим каркасом ГВ и более эффективной адсорбцией бактерий на поверхности гексадекана в присутствии ГВ.

Полученные результаты показывают, что добавление гуминовых веществ может улучшать рост бактерий-нефтедеструкторов на углеводородах нефти в условиях холодного климата, а следовательно, и действие биопрепарата «МикроБак», который используют для ликвидации нефтяных загрязнений.

#### Литература

1. Гуминовые вещества./ Горювая А.И., Орлов Д.С., Щербенко О. В. Киев, 1995. 304 с.
2. Действие гуминовых кислот на рост бактерий / В.В. Тихонов, А.В. Якушев, Ю.А. Завгородняя [и др.] // Почвоведение. 2010. № 3. С. 333 – 341.
3. Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата./ Филонов А.Е.//Пушино. 2016. С. 3-4.
4. Сравнительная характеристика методов выделения гуминовых веществ из торфов с целью получения гуминовых препаратов //Автоматизированные системы обработки информации, управления и проектирования. М.В. Гостищева, И.В. Федько, Е.О. Писниченко. Доклады ТУСУРа, 2004. С. 66–69.

### **Штаммоспецифичность биохимических и физиологических параметров утилизации глифосата у бактерий рода *Achromobacter***

*Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН;  
alhummen@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_214-216

По современным данным, фосфор – макроэлемент, необходимый для функционирования всех живых систем – может включаться в биологический круговорот не только в виде фосфатов, но и в любой степени окисления. Среди восстановленных соединений фосфора наиболее важную роль играют органофосфонаты (ОФ), содержащие прямую связь С–P<sup>3+</sup>, устойчивую к гидролизу и действию фосфатаз. Природные ОФ могут замещать фосфаты как структурные компоненты клетки, использоваться для запасаания фосфора, выступать биологически активными вторичными метаболитами. Синтетические ОФ применяются как пестициды и хелатирующие агенты. Наиболее распространен глифосат (N-фосфонометилглицин, ГФ) – неселективный гербицид, ингибирующий синтез ароматических аминокислот. Объемы применения синтетических ОФ превышают 1 млн. тонн в год, не менее 800 тыс. тонн составляет ГФ. С бесконтрольным поступлением ОФ в окружающую среду связаны серьезные экологические риски, являющиеся предметом активных дискуссий. Проблема трансформации и деградации ОФ в природе весьма актуальна с практической и фундаментальной точек зрения.

Основной вклад в биодеструкцию ОФ вносят бактерии, обладающие ферментными системами, расщепляющими С–Р связь (С–Р лиаза, фосфонатаза и др.). До 40% расшифрованных бактериальных геномов содержат цистроны, кодирующие такие ферменты. Однако способность утилизировать ГФ как источник фосфора описана лишь у отдельных изолятов. Исследований взаимосвязи между наличием такой способности и систематическим положением микроорганизма не проводились; также не выяснен вопрос

о генетических детерминантах, обеспечивающих возможность утилизации ГФ у прокариот.

Методика, позволяющая связать эффективность потребления ГФ с доступными для экспресс-анализа генетическими признаками бактерий, значительно упростила бы поиск перспективных деструкторов гербицида и интерпретацию данных метагеномных исследований сред, загрязненных ГФ. Изучение возможности решения данной задачи на примере деструкторов ГФ рода *Achromobacter* с помощью методов генетического типирования стало целью настоящей работы.

В лабораторной коллекции было отобрано 6 наиболее эффективных деструкторов ГФ рода *Achromobacter*, выделенных из загрязненных ОФ почв (Табл. 1) и лабораторный штамм, полученный при многократных пассажах *A. aegrifaciens* Km 11 на селективных средах с ГФ. Новый штамм, обозначенный как *A. aegrifaciens* Km 11A, отличался от дикого типа физиологическими и биохимическими характеристиками (Табл. 1).

Для таксономического определения бактерий и выявления степени их родства проводился анализ гена нуклеотидредуктазы *NrdA*. Из литературы известно, что секвенирование участка гена длиной 765 п.н. (локус *NrdA\_765*) позволяет достоверно определять не только видовую принадлежность бактерий рода *Achromobacter*, но и выявлять устойчивые геногруппы внутри одного вида. Проводилась ПЦР с геномной ДНК деструкторов ГФ с праймерами 5' GAACTGGATTCCCGACCTGTTC 3' (*NrdA\_F*) и 5' TTCGATTTGACGTACAAGTTCTGG 3' (*NrdA\_R*), продукт ПЦР длиной 954 п.н. секвенировался ЗАО «Евроген», полученные нуклеотидные последовательности анализировались с помощью базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Также применялся метод геномных фингерпринтов с ПЦР повторяющихся палиндромных элементов (Rep-ПЦР) с праймером BOX-A1R 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3' с разделением амплифицированных фрагментов электрофорезом в агарозном геле и типированием штаммов по количеству и длине выявленных ампликонов.

Табл. 1. Физиологические и биохимические параметры утилизации ГФ у различных геногрупп *Achromobacter*

Штамм	Регион выделения/ОФ в почве	Потребность в адаптации к ГФ, результат	Максимальная биомасса, г/л	Удельная деструкция ГФ, мг/г биомассы	Аллель <i>NrdA_765</i>	Группа по геномному фингерпринту	Биохимические особенности утилизации ГФ
<i>Achromobacter aegrifaciens</i> Km 11	Краснодар /ГФ	Требовалась, сокращение лаг-фазы	0,7±0,2	97±8	69	Нет данных	Нет
<i>A. aegrifaciens</i> Km 11A	Лаборатория/ГФ	Не требовалась	1,1±0,1	111±5	69	Нет данных	Экспрессия двух изоформ фосфонатазы на средах с ГФ
<i>A. insolitus</i> Kg 13	Краснодар /ГФ	Не требовалась	2,1±0,4	59±3	6	1	Нет
<i>A. aegrifaciens</i> Kg 16	Краснодар /ГФ	Не требовалась	1,2±0,1	71±6	280	4	Наличие ГФ-ацетилтрансферазы
<i>A. insolitus</i> Kg 19	Краснодар /ГФ	Не требовалась	1,6±0,2	74±9	9	Нет данных	Экспрессия двух изоформ

							фосфонатазы на средах с ГФ
<i>A. aegrifaciens</i> Km 102	Краснодар /ГФ	Требовалась, увеличение биомассы, сокращение лаг-фазы	1,6±0,1 (0,2±0,05 до адаптации к ГФ)	57±4	280	4	Две С–Р лиазы, специфичные либо к МФК либо к ГФ
<i>A. aegrifaciens</i> Sm 51	Шиханы /МФК	Требовалась, увеличение биомассы, сокращение лаг-фазы	2,3±0,4 (0,2±0,1 до адаптации к ГФ)	50±4	100	3	Две С–Р лиазы, специфичные либо к МФК либо к ГФ

Результаты верифицировались с помощью ДНК-ДНК гибридизации *in silico* полногеномных нуклеотидных последовательностей и определения показателя ANI (Average Nucleotide Identity). NGS-секвенирование *de novo* проводилось ООО «Ридсенс» с помощью прибора Illumina MiSeq.

Показано, что биохимические параметры утилизации ГФ у исследованных штаммов носят штаммоспецифичный характер и не связаны с принадлежностью к определенному виду или геногруппе внутри вида. *A. aegrifaciens* Km 102 и *A. aegrifaciens* Sm 51 выделены в двух географически отдаленных регионах под селективным давлением разных ОФ, принадлежат к разным группам по локусу *NrdA\_765* и геномному фингерпринту. Однако они практически идентичны по ростовым характеристикам на средах с ГФ, по особенностям адаптации исходных изолятов к потреблению гербицида, а также по наличию у них двух независимо индуцирующихся С–Р лиазных систем. Напротив, *A. aegrifaciens* Kg 16, принадлежащий к тем же группам, что и *A. aegrifaciens* Km 102, экспрессирует не ГФ-специфичную С–Р лиазу, а новую ГФ-ацетилтрансферазу и не способен к длительному потреблению гербицида как источника фосфора. *A. aegrifaciens* Km 11 и отделившийся от него в результате спонтанной диссоциации *A. aegrifaciens* Km 11А (практически идентичный родительскому штамму по показателю ANI) имеют не только отличающиеся ростовые параметры, но и разный набор ферментов деструкции ОФ: у штамма Km 11А впервые показано наличие двух изоформ фосфонатазы. Также две изоформы фермента обнаружены нами у представителя другого вида – *A. insolitus* Kg 19, что отличало его от *A. insolitus* Kg 13.

Таким образом, широко применяемые для *Achromobacter* и родственных родов методики типирования и оценки патогенности не позволяют проводить отбор потенциально эффективных деструкторов ГФ с заданными биохимическими параметрами. Решение этой задачи потребует углубленного анализа геномов изучаемых бактерий и выявления участков, определяющих возможность утилизации гербицида конкретным штаммом, и оценки возможности использования этих участков для типирования деструкторов ГФ.

*Работа проводилась при поддержке РФФИ (проект 18-74-0021).*

## Цито-физиологическая характеристика двух штаммов грамположительных ультрамикробактерий, выделенных с кожного покрова серой жабы *Bufo bufo* и оценка их биотехнологического потенциала

<sup>1</sup>Сузина Н.Е., <sup>1,2</sup>Абашина Т.Н., <sup>1</sup>Поливцева В.Н., <sup>2</sup>Соболева О.И.,  
<sup>3</sup>Сорокин В.В., <sup>1</sup>Звонарев А.Н., <sup>1</sup>Мачулин А.В., <sup>1</sup>Шорохова А.П., <sup>1</sup>Дуда В.И.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
suzina\_nataliya@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_217-218

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

<sup>3</sup>ФИЦ «Биотехнология» РАН

Микробные симбионты (эпibiонты) кожных покровов земноводных способны продуцировать различные вещества, обладающие высокой антимикробной активностью, тем самым с одной стороны предотвращая колонизацию покровов болезнетворными микроорганизмами из окружающей среды и параллельно стимулируя секрецию защитных пептидов кожными железами лягушек (Conlon et al., 2012; Clay, 2014; King et al., 2012). Многие из культивируемых симбионтов земноводных являются продуцентами ряда перспективных для биотехнологии биологически активных веществ. Исследования последних десятилетий обнаружили, что поверхность кожных покровов земноводных южных ареалов распространения является местом обитания представителей более тридцати родов бактерий, таких как *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodococcus* и др. (Antwis et al., 2014; Becker et al., 2015; De Assis et al. 2017). В то же время, информация о выделении ультрамикробактерий (УМБ) из подобных источников практически отсутствует. Недавно с поверхности кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (ареал обитания: Центральная и Южная Африка) нами были выделены два штамма УМБ, относящийся к роду *Chryseobacterium* (штаммы FM1 и FM2) (Росс с соавт., 2019). Информация о микробиоме кожных покровов серой жабы *Bufo bufo*, которая широко распространена в средней полосе России, фактически отсутствует. Исследования в этой области не ведутся.

С поверхности слизистых кожных покровов серой жабы *Bufo bufo* нами были выделены два штамма УМБ: Bht2 и Bht3. По результатам анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК эти штаммы были отнесены к родам актинобактерий *Nocardioides* sp. (шт. Bht2) и *Marmoricola* sp. (шт. Bht3). Оба штамма представлены ультрамелкими грамположительными кокковидными клеточными формами.

Проведенные микробиологические и морфометрические исследования с применением фазово-контрастной микроскопии по сравнительному изучению размеров/объемов клеток обоих штаммов в условиях роста на питательных средах различного состава и концентрации (среда 5/5, R2A, TSA, BBL и их разведенные в 10 раз варианты) показали, что оба штамма различаются по скорости роста и требовательности к концентрации испытываемых питательных сред. Штамм Bht2 отличается быстрым ростом практически на всех вариантах сред, в то время как штамм Bht3 является медленно растущей культурой даже в условиях роста на богатых питательных средах TSA и LB. Клетки штамма Bht2 представлены ультрамелкими клетками кокковидной формы диаметром 0,3–0,35 мкм, в условиях роста, как на богатых, так и на бедных средах. Размер клеток штамма Bht3 варьирует и своего минимального значения достигает на среде R2A и ее разбавленном варианте ( $d = 0,3$  мкм), на богатых средах данный штамм представлен рефрактерными кокками диаметром 0,35–0,4 мкм.

Изучены физиолого-биохимические особенности изолятов с применением тест систем «bioMerieux» (Франция). Результаты исследования позволяют сделать вывод, что штаммы Bht2 и Bht3 являются уреаза-отрицательными, оксидаза- и каталаза-положительными, способны разжижать желатин и утилизировать цитраты. В то же время, имеются и существенные различия между изолятами. Штамм Bht2 способен утилизировать широкий ряд соединений: L-арабинозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-маннит, амигдалин, эскулин, салицин, D-целлобиозу, D-мальтозу, D-сахарозу, D-трегалозу, D-меллецитозу, ксилит, гентибиозу, D-туранозу, в отличие от него штамм Bht3 не способен к утилизации исследуемых сахаров.

На моделях новых грамположительных изолятов шт. Bht2 и Bht3 проведены эксперименты по получению магнитотактных наноконтейнеров. Показано, что в модельных экспериментах в условиях инкубации в разработанной авторами среде, содержащей минеральную форму железа, клетки обоих штаммов приобретают способность двигаться в направлении приложенного постоянного магнита, сохраняя при этом целостность (полное отсутствие лизиса) и минимальный для этих штаммов размер/объем клеток. Таким образом, оба штамма представляются весьма перспективными для дальнейшей разработки на их основе средств доставки терапевтических агентов в различные органы и ткани человека и животных.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Основы высоких технологий и использование особенностей наноструктур в науках о природе».*

#### Литература

1. Clay K. Defensive symbiosis: a microbial perspective // *Funct. Ecol.* 2014. V. 28. P. 293–298.
2. Conlon J.M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions // *Cell. Mol. Life. Sci.* 2011. V. 68. P. 2303–2315.
3. King J.D., Mechkarska M., Coquet L., Leprince J., Jouenne T., Vaudry H., Takada K., Conlon J.M. Host-defense peptides from skin secretions of the tetraploid frogs *Xenopus petersii* and *Xenopus pygmaeus*, and the octoploid frog *Xenopus lenduensis* (Pipidae) // *Peptides.* 2012. V. 33. P. 35–43.
4. De Assis A.B., Barreto C.C., Navas C.A. Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens // *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179628> July 5, 2017.
5. Becker M. H., Walke J. B., Murrill L., Woodhams D.C., Reinert L.K., Rollins-Smith L. A., Burzynski E. A., Umile T.P., Minbiole K.P.C., Belden L.K. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* // *Molecular Ecology.* 2015. Vol. 24, P. 1628–1641.
6. Росс Д.В., Сузина Н.Е., Гафаров А.Б., Мачулин А.В., Есикова Т.З., Шорохова А.П., Дуда В.И., Боронин А.М Характеристика ультрамелких бактерий рода *Chryseobacterium* FM1 и FM2, выделенных с кожных покровов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* // *Микробиология*, 2019, Т. 88, № 2, с. 184-196.

#### **Долговременная генерация электроэнергии микробным топливным элементом**

***Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Решетилов А.Н.***

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; setar25@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_218-220

Биотопливные элементы (БТЭ) относятся к устройствам, осуществляющим прямое превращение химической энергии различных соединений в электрическую в процессе биологической трансформации. БТЭ являются альтернативными источниками энергии, и интерес к их разработке обусловлен во многом возможностью использования в них в качестве топлива отходы производств. У микробных топливных элементов (мБТЭ) имеются свои преимущества перед ферментными, такие как широкий круг окисляемых субстратов и большая стабильность, кроме того, микробные клетки требуют меньших затрат на приготовление и очистку. При этом важнейшей задачей при создании любых БТЭ является повышение мощности системы.

Целью работы было создание долговременно работающего микробного топливного элемента на основе бактериальных клеток, пригодного для питания различных маломощных устройств. В качестве модельного биокатализатора использовали штамм *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280.

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанные кюветы, объём анодного отделения был равен объёму катодного и составлял 50 мл. В качестве анода и катода БТЭ использовались спектральные графитовые электроды в виде цилиндров высотой 65 мм и радиусом 3 мм, общей площадью 7.5 см<sup>2</sup>. Для приготовления биокатализатора использовали смесь суспензии бактериальных клеток (1 мг сырого веса/мкл) и хитозана (2 %-ый раствор в 1 %-й уксусной кислоте). Для увеличения генерируемого сигнала электроды мБТЭ модифицировали многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ). Содержание клеток и наноматериала на поверхности электрода составляло 0.12 мг сырого веса/мм<sup>2</sup> и 1.57 мкг/мм<sup>2</sup>, соответственно. В качестве фонового раствора использовали 25 мМ калий-фосфатный буфер рН 6.5, содержащий 10 мМ хлорида натрия, а в качестве медиаторов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ, 42 мкМ) в анодном отделении и гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ, 4 мМ) в катодном. Этиловый спирт в концентрации 10 мМ применяли как субстрат для клеток *G. oxydans*. В качестве устройства для накопления генерируемой мБТЭ энергии использовали конвертер, основанный на микросхеме bq25504 (Texas Instruments, США).

Одиночный мБТЭ на основе клеток *G. oxydans* генерирует напряжение не достаточное для того, чтобы эффективно запускать конвертер и производить зарядку конденсатора. Эта особенность зарядки связана с характеристикой используемой микросхемы bq25504, требующей величины входного напряжения от 300 мВ и выше. Последовательное включение двух мБТЭ позволяет суммировать их напряжение, что обеспечивает условие стартового напряжения конвертера ( $U \geq 330$  мВ). При этом внутреннее сопротивление системы не уменьшается, однако происходит увеличение суммарного напряжения на выходе мБТЭ.

На рисунке 1 представлены графики заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ различными парами мБТЭ, включенными последовательно. Два немодифицированных биотопливных элемента заряжали конденсатор в 6800 мкФ за 80 минут, при этом большую часть времени занимала фаза медленного заряда (68 минут). При модификации мБТЭ нанотрубками общее время заряда снижается до 60 минут. Следует отметить, что два последовательно соединенных модифицированных нанотрубками мБТЭ эффективно заряжали конденсатор в 6800 мкФ за 42 мин после 24 часов непрерывной работы. Через двое суток непрерывной работы БТЭ время заряда конденсатора уменьшалось более чем в 2 раза по сравнению с двумя немодифицированными МУНТ элементами и составило 30 мин. Фаза медленного заряда (до 1.7 В) с низким КПД функционирования конвертера занимала 28 мин, фаза быстрого заряда с высоким КПД – 4 мин, общее время заряда конденсатора составляло 32 мин. Можно предположить, что

такое улучшение параметров мБТЭ обусловлено явлением адаптации микроорганизмов к внешним условиям.

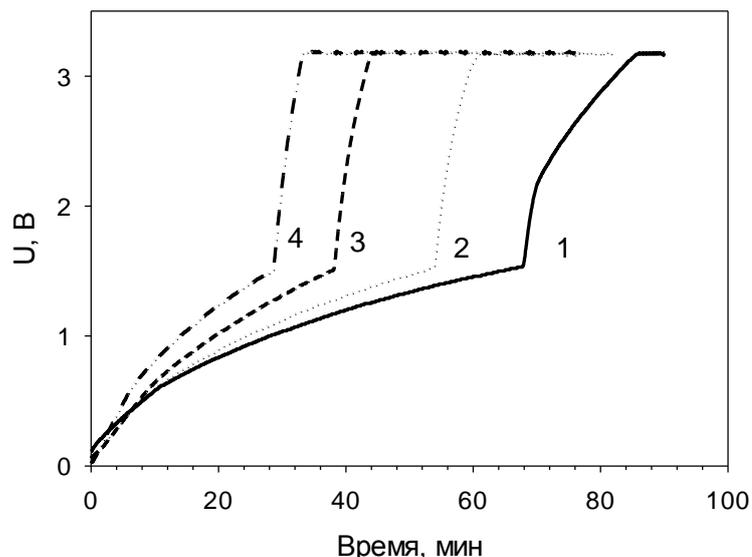


Рис. 1. Зависимость заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ от условий работы мБТЭ: 1- немодифицированные мБТЭ, 2 – модифицированные МУНТ мБТЭ; 3 – модифицированные МУНТ БТЭ через 24 час работы; 4 – модифицированные МУНТ мБТЭ через 48 час работы.

Для определения долговременной стабильности мБТЭ оценивали величину генерируемого напряжения в режиме разомкнутой внешней цепи в течение 3 недель. Разработанные мБТЭ непрерывно генерировали электроэнергию в течение 5 дней без дополнительного введения субстрата. После смены анолита и католита происходила дальнейшая генерация электроэнергии. Установлено, что падение генерируемого напряжения на 16-е сутки составило 73%, что позволяет многократно использовать разработанный мБТЭ. После завершения генерации электроэнергии была проведена оценка чистоты биокатализатора, для чего осуществили соскоб с анодов мБТЭ. После посева полученного соскоба на чашки Петри, культура образовала однородные по морфологии, консистенции и пигментации колонии. Это означает, что за 3 недели работы мБТЭ не происходит бактериального загрязнения культуры.

Заряженный конденсатор емкостью в 30000 мкФ (время заряда составляло 80 мин) был использован для питания устройства с Bluetooth-передатчиком и тремя сенсорами (температура, влажность, освещенность) в течении 2 минут чистого времени (предварительные данные были представлены на 4м Мировом Форуме, посвященном Интернету Вещей).

Подобные устройства могут быть использованы как часть технологии «Интернет вещей» для мониторинга различных показателей окружающей среды с периодичностью опроса сенсоров примерно раз в 2 часа.

## **Участие инфузорий в мониторинге эвтрофированных водных объектов**

*Трибун М.М.*

Дальневосточный государственный университет путей сообщения, г. Хабаровск,  
tribunmikhail@gmail.com

Согласно ГОСТ 17.01-77 под эвтрофикацией понимают повышение биологической продуктивности водных объектов вследствие накопления в воде биогенных элементов [1]. Эвтрофикация воды является одной из наиболее актуальных экологических проблем современности. За последние 50 лет ученые регистрируют процессы «цветения» воды практически всех крупных водоемов, водотоков и водохранилищ.

Сегодня научно доказана взаимосвязь между качеством такой воды и состоянием здоровья человека. В современной медицинской практике данное заболевание получило название – алиментарно-токсическая пароксизмальная миоглобинурия (АТПМ) или «Гаффская болезнь». Это хронический алиментарный токсикоз 5 видов рыб, кошек, человека и некоторых других животных, поражающий нервную систему, почки и скелетную мускулатуру, вызывая разрушение мышечной ткани всех органов [2].

Зообентос является одним из самых чувствительных компонентов экосистемы водоема к ее изменениям. Сообщества донных животных, в отличие от планктонных организмов, в силу присущей им инертности служат индикаторами изменений, происходящих в экосистеме водного объекта. Таким образом, структурно-функциональные характеристики сообществ зообентоса, в том числе и инфузорий (Ciliata), служат отличными индикаторами трофности водных экосистем.

**Цель работы** – выявить изменения некоторых структурно-функциональных параметров цилиофауны в ходе процесса эвтрофикации.

#### **Материал и методы исследования**

Отбор гидробиологического материала осуществляли из центрального городского пруда (р-н парка «Динамо») в течение вегетационного периода с 2017 по 2019 года. Наблюдение за инфузориями производили *in vivo* и *in vitro* при помощи микроскопов фирм «Leica», «Motic» и «Ломо».

Фиксацию цилиофауны осуществляли кальций-формолом (по Бейкеру), фиксаторами Люголя и Да-Фано, для выявления общей морфологии клеток применяли растворы метиленового синего, эозина и йода. Видовое определение цилиата производили при помощи определителей Фойсснера и Бергера [3].

#### **Результаты и обсуждение**

В ходе инвентаризации видового состава цилиата было выявлено 42 вида инфузорий, относящихся к 10 классам. Самыми многочисленными были классы Oligohymenophorea и Spirotrichea, насчитывающие по 10 видов, что суммарно составляет 47,6% от всего видового разнообразия цилиофауны центрального пруда. Наибольшее количество представителей цилиосообщества относились к родам *Paramecium* (*Paramecium aurelia*, *P. bursaria*, *P. caudatum*) и *Oxytricha* (*Oxytricha fallax*, *O. minor*, *O. chlorelligera*).

Анализ данных позволил установить следующие закономерности:

- максимальное число видов цилиата приходится на летний сезон, что более чем в два раза превышает количество представителей протистофауны весной. В летний период (июль-август) процесс эвтрофирования центрального пруда достигает своего пика за счет достижения определенных количественных значений ряда факторов окружающей среды, играющих важную роль в динамике «цветения» биотопа, в первую очередь, температуры (+25+27<sup>0</sup>C). Кроме того, отсутствие течения и ветрового перемешивания является мощным толчком для развития фитопланктона. В осенний период видовое разнообразие цилиофауны становится беднее, что по мнению ряда авторов является следствием неблагоприятной экологической обстановки в водном объекте [4];

- в ходе изменения трофического статуса водоема, наблюдалась трансформация пищевых связей в цилиосообществе. Например, в весенний период 2017 года ядро фауны инфузорий представляют виды – хищники (33,3%) и бактерио-детритофаги (41,6%). Суммарно на долю этих групп приходится 2/3 от общего числа обнаруженных видов. В летний сезон соотношение трофических групп изменяется: хищники (10%), бактериофаги

(63,3%). Кроме того, значительно возросла доля альгофагов, пищей которым служат водоросли (20%). Осенью такая тенденция сохраняется. Доля хищников снижается до 4,7%, а альгофагов увеличивается до 28,5%;

- в ходе исследования было выявлено только два вида, регистрировавшиеся постоянно – *Aspidisca cicada* и *Paramecium caudatum*. Видовой дефицит в сообществе гидробионтов в ходе изменения трофического статуса водоема отмечался и другими авторами [5,6]. Кроме того, согласно Н.С. Жмур [7] массовое развитие инфузорий рода *Paramecium* является следствием накопления в воде органических соединений, которые зачастую имеют биогенное происхождение (стиральные порошки, удобрения, моющие средства). Доказано, что причиной антропогенного эвтрофирования водоема является значительное повышение концентрации нитратов и фосфора.

- достоверным признаком изменения трофии водного объекта явилось появление эндоцитобионтов инфузорий, в качестве симбионтов выступают зеленые водоросли, преимущественно зоохлорелла. В летне-осенний период 2019 года было зарегистрировано три таких вида: *Didinium chlorelligerum*, *Oxytricha chlorelligera*, *Stentor polymorphus*. Почти исключительный путь попадания водорослей в клетку протистов – заглатывание их вместе с пищей. Научно доказано, что симбионты могут занимать до 75% объема клетки хозяина [8]. Некоторые исследователи [9] считают, что присутствие альгосимбионтов у инфузорий помогает им переживать неблагоприятные условия – дефицит пищи или понижение содержания кислорода в воде.

*Работа выполнена при поддержке гранта «УМНИК» (договор №12518ГУ/2017).*

#### Литература

1. Реймерс Н.Ф. Природопользование: Словарь-справочник. М.: Мысль, 1990. 637 с.
2. Науменко М.А. Эвтрофирование озер и водохранилищ. СПб: РГГМУ, 2007. 100 с.
3. Foissner W., Berger H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology // *Freshwater Biology*. 1996. Vol. 35. P. 375–482.
4. Pawlik-Skowronska B., Toporowska. How to mitigate cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in eutrophic water reservoirs? // *Hydrobiologia*, 2016. p.45-59.
5. Речкалов В.В., Голубок О.В., Шиманская М.Л. Вертикальное распределение коловраток в озерах с различным трофическим статусом // *Вестник Оренбургского государственного университета*. №10. Оренбург, 2015. С.112-117.
6. Цымбалева Г.А., Кузьмин С.Ю. Трофические характеристики озера Изумрудного (Национальный парк "Куршская коса") // *Известия КГТУ*. №43. Калининград, 2016. С.78-86.
7. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
8. Hecky R.E., Kling H.J. The phytoplankton and protozooplankton of the euphotic zone and lake Tanganyika, species composition, biomass, chlorophyll content and spatio-temporal distribution // *Limnol. Oceanogr.* №26, 1981. P. 548-564.
9. Caron D.A., Finlay B.J. Protozoan links in food webs. *Progress in Protozoology*. Stuttgart. P.125-130.

# Биотехнология и биологическая безопасность

*Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б.*

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, п. Оболенск; info@obolensk.org, DOI: 10.18334/ibpm2019\_223-225

Главной задачей биологической безопасности является обеспечение безопасности персонала и окружающей среды от заражения микроорганизмами. Поэтому параллельно развитию микробиологии и биотехнологии специалисты в области биологической безопасности постоянно разрабатывают и совершенствуют правила и приемы лабораторной и технологической работы, которые призваны обеспечить личную безопасность персонала при ее проведении, а также различные защитные приспособления, приборы и оборудование, одежду. [1, 2].

С точки зрения биологической безопасности проведение работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) с использованием аппаратов и систем биотехнологического назначения наиболее опасный и аварийно значимый процесс. Во время этих работ могут возникать ситуации, как техногенного, так и антропогенного характера. Все работы связаны с высококонцентрированными препаратами, содержащими ПБА (ферментация, концентрирование, высушивание), возможным образованием аэрозоля микроорганизмов (концентрирование, высушивание, измельчение), а также наличием большого объема биомассы (ферментация, концентрирование).

Каждый этап биотехнологического процесса - это, практически, законченный цикл работы с ПБА и для каждого из них определены конкретные требования биологической безопасности. Они относятся к помещениям и оборудованию, средствам индивидуальной защиты, обеззараживанию твердых и жидких отходов, а также процесс допуска сотрудников к проведению работ в биотехнологическом блоке «заразных» помещений.

Соответственно, все этапы работы с ПБА для проведения биотехнологического процесса должны быть правильно оформлены: иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о наличии условий для выполнения данного вида работ и соответствия нормативным документам, и лицензию на проведение работ.

Возникает справедливый вопрос: кто лучше, качественней и безопасней проведет биотехнологический процесс - врач, биолог или инженер-технолог? На наш взгляд лучше это сделает инженер-технолог. Естественно, что у него должны быть определенные теоретические и практические знания в области биологической безопасности и постоянный контакт во время проведения процесса со специалистами медико-биологического профиля.

В доступной нам литературе мы не встретили материалов, позволяющих судить об обеспечении требований биологической безопасности при проведении биотехнологических работ комплексно. Поэтому, целью настоящей работы является рассмотрение вопроса обеспечения и контроля соблюдения требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с большими объемами, концентрациями микроорганизмов I-IV групп патогенности.

С точки зрения соблюдения требований биологической безопасности подготовка помещения, оборудования, приборов и аппаратов для проведения биотехнологических исследований является сложным, но обязательным процессом. Эти помещения относятся к лабораториям различных уровней биологической безопасности по международной классификации и требуют особого подхода.

Биотехнологические процессы ведут с высококонцентрированным материалом. Все операции должны сопровождаться и поддерживаться соответствующими

дезинфекционными мероприятиями, которые выполняют с использованием свежеприготовленных, проверенных рабочих дезрастворов. В обязательном порядке готовят аварийный запас дезсредств. Следовательно, все этапы биотехнологического процесса должны быть отражены в соответствующих разделах инструкций по проведению работ.

В биотехнологии, если используют для получения биомассы патогенные микроорганизмы, процесс проводят в максимально безопасных для исполнителя и окружающей среды условиях. Ограждающие поверхности должны быть покрыты герметизирующим составом, устойчивым к моющим и дезинфицирующим растворам. Это связано с тем, что эти процессы связаны с высококонцентрированным материалом, содержащим ПБА. Для того чтобы обеспечить надлежащее выполнение требований биологической безопасности при проведении этапов биотехнологического процесса необходимо выполнить ряд условий.

Во-первых, желательно соединить все этапы биотехнологического процесса в единую цепочку. Например, внутреннюю емкость ферментера, установленного в помещении ферментационного зала (сепарация идет следующей стадией технологического процесса за ферментацией), с сепаратором, чтобы не было возможного попадания материала в рабочее помещение.

Во-вторых, необходимо определить типы защитной одежды, в которой будут работать сотрудники.

В-третьих, необходимо подготовить самих сотрудников. Они должны обладать определенными навыками работы с ПБА, окончить соответствующие курсы с основами биобезопасности, пройти входной медицинский осмотр, при необходимости получить профилактические прививки и они должны быть допущены к данным работам приказом руководителя.

В-четвертых, все инженерные системы биологической безопасности и приборы должны быть подготовлены к работе, опробованы и аттестованы с составлением актов и протоколов, которые представляются в комиссию по контролю соблюдения требований биологической безопасности.

Необходимо убедиться, что все помещения, предназначенные для проведения работ, соответствуют требованиям биологической безопасности. Подлежат обязательной проверке с составлением актов готовности к эксплуатации условия вентиляции рабочих помещений – принудительный механический с постоянным разрежением до минус 150-250 Па, достаточным обменом воздуха (до 10 раз в час) и очисткой подаваемого и выбрасываемого воздуха на высокоэффективных фильтрах очистки воздуха класса не ниже Н-14. Все параметры, полученные в результате проверки, документируют и оформляют в виде протоколов и актов.

Системы обеззараживания жидких и твердых отходов (паровые стерилизаторы и станции тепловой обработки стоков) проверяют на техническую и защитную эффективность. Все параметры, полученные в результате проверки процессов, документируют и оформляют в виде протоколов и актов.

Биотехнологические процессы, используемые для производства различных биопрепаратов, а также манипуляции с сырьем, материалами, реактивами, субстратами, оборудованием, производственными штаммами микроорганизмов, упаковочными материалами должны гарантированно обеспечивать безопасность для персонала и окружающей среды.

Все производственные процессы должны быть регламентированы и документированы и обеспечить неизменность производства продукции, отвечающей параметрам качества и требованиям безопасности и защиты экологии.

## Литература

1. Дмитриева В.А. Учебное пособие по биобезопасности, / В.А. Дмитриева, А.М. Воронин, В.В. Дмитриев, О.Н. Доброхотский, Г.А. Жариков, Л.В. Коломбет, А.В. Наголкин, Е.А. Тюрин, М.В. Храмов // Тула. Изд-во ТулГУ, 2013. - 500 с.
2. Laboratory Biosafety Guidelines. 3-rd Edition. Canada. 2004. -113 p.

### **Биоремедиация нефтезагрязненных почв республики Беларусь с использованием биопрепарата «Микробак» и сорбента на основе лигнина**

<sup>1</sup>Филонов А.Е., <sup>1</sup>Пунтус И.Ф., <sup>1</sup>Ахметов Л.И., <sup>1</sup>Фунтикова Т.В., <sup>2</sup>Алехин Р.С.,  
<sup>1</sup>Боронин А.М.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
г. Пушино; filonov.andrey@rambler.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_225-226  
<sup>2</sup>ООО «НПК «Альтернативные технологии», г. Москва

Промышленная добыча углеводородов в Беларуси началась с 1965 г. и сосредоточена в районе Припятского прогиба (Гомельская и Могилевская области). Добычу нефти в Республике Беларусь осуществляет нефтегазодобывающее управление «Речицанефть» – ведущее обособленное подразделение предприятия «Белоруснефть». Большая часть доказанных запасов нефти в белорусском регионе относится к трудноизвлекаемым. Основной объем углеводородов получен из наиболее крупных месторождений: Речицкого, Осташковичского, Вишанского, Южно-Осташковичского. В процессе добычи и транспортировке происходит загрязнение почв углеводородами. Нефтяное загрязнение приводит к негативным изменениям в почвенных биоценозах, а также к изменениям в химическом составе, структуре и свойствах почв, снижению их плодородия. Высокие концентрации углеводородов нефти токсичны для микроорганизмов как аборигенных, так и инокулированных. Для преодоления этой проблемы эффективно одновременное применение биопрепаратов и сорбентов, которые создают оптимальные условия для жизнедеятельности почвенной микробиоты и ускоряют процесс биоремедиации.

Целью данной работы было оценить эффективность технологии очистки почвы от нефтяных загрязнений за счет внесения биосорбента (сухого лигнина) и биопрепарата «Микробак». Препарат «Микробак» разработан в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрябина. В состав биопрепарата входят нефтеокисляющие бактерии родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Лигнин представляет собой смесь ароматических полимеров родственного строения. Часто лигнин определяют как олигомер, преимущественно состоящий из фенилпропановых мономеров. Гидролизный лигнин представляет собой крупнотоннажный отход при гидролизе древесины. Испытания проводились в Гомельской области Республики Беларусь недалеко от г. Речица в июне-августе 2018 г. В работе использовались нефтезагрязненные почвы с месторождений «Речица», «Осташково», «Гиреево». В нефтезагрязненную почву вносили жидкий биопрепарат «Микробак» (полученный путем растворения в воде сухого концентрированного биопрепарата с КОЕ не менее  $1 \times 10^{10}$ ) из расчета не менее  $1 \times 10^5$  бактерий на 1 г почвы). Затем вносили сухой лигнин из расчета 0,5 кг лигнина на 1 кг нефти. Также вносили минеральные соли (нитроаммофоска) и обеспечивали оптимальную влажность путем дождевания. Для равномерного смешивания почва перепахивалась 2-4 раза в месяц. Отбор

проб для анализа углеводов проводили до внесения биопрепарата и сорбента, через час после внесения биопрепарата и сорбента, через месяц и в конце эксперимента. Данные представлены на рисунке 1.

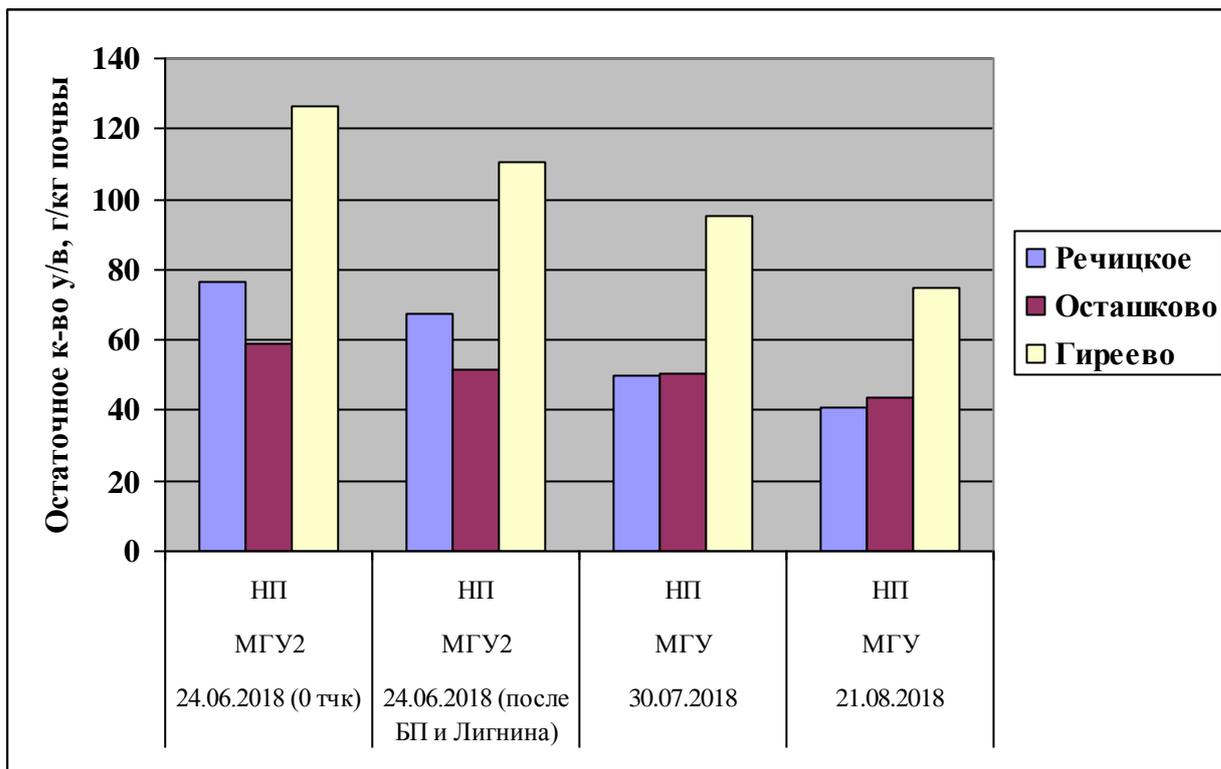


Рис. 1. Убыль углеводов в нефтезагрязненной почве различных месторождений после внесения лигнина и биопрепарата

Анализ углеводов в исследуемых почвах показал, что сразу же после внесения сорбента (лигнина) происходит снижение концентрации на 10% вследствие сорбции нефти на лигнине. В течение двух месяцев биоремедиации заметное снижение углеводов нефти (на 50%) наблюдалось в почвах с месторождения «Гиреево», где исходная концентрация нефти составляла 135 г/кг почвы. В почвах с месторождений «Речицкое» и «Гиреево», где исходная концентрация углеводов нефти была 60-75 г/кг почвы, снижение концентрации наблюдалось на 30-50%.

Таким образом, очевидно, что наиболее эффективной представляется технология очистки почвы от нефтяных загрязнений путём интродукции биопрепарата с внесением сухого лигнина, что в 2 раза ускоряет процесс ремедиации.

Работа выполнена с использованием уникальной научной установки ОТУ ИБФМ РАН (USU 279218)

### Полногеномное секвенирование термофильного штамма *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup>, перспективного для биотехнологии стероидов

<sup>1</sup>Фокина В.В., <sup>1</sup>Лобастова Т.Г., <sup>1</sup>Брагин Е.Ю., <sup>2,3</sup>Штратникова В.Ю.,  
<sup>1</sup>Стародумова И.П., <sup>1,4</sup>Тарлачков С.В., <sup>1</sup>Донова М.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,

Ферменты термофильных микроорганизмов благодаря их уникальной способности противостоять воздействию самых разнообразных агрессивных внешних факторов в настоящее время находят широкое применение при производстве моющих средств, пищевых продуктов, кормов, в целлюлозно-бумажной, текстильной и горнодобывающей промышленности, а также – переработке различных отходов (1,2). Однако сообщения об использовании термофильных бактерий, способных специфически модифицировать стероидные соединения, крайне редки (3). Сообщалось о способности лишь некоторых термофильных микроорганизмов модифицировать стероиды (4-9). Умеренно термофильный актинобактериальный штамм *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* исходно был выделен из спонтанно разогревающихся волокнистых остатков сахарного тростника, остающихся после процесса экстракции сахара (10). Недавно нами было показано, что штамм *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup> способен трансформировать литохолевую кислоту (11) и некоторые другие стероидные субстраты (12,13). В данной работе впервые было проведено определение нуклеотидной последовательности и выполнен биоинформатический анализ полного генома типового штамма *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup>.

Штамм культивировали на среде, содержащей (г/л): глюкозу – 7, крахмал – 10 и соевый пептон – 7 (рН 7,0-7,2) в аэробных условиях (200 об/мин) при 45°C в течение 48 часов. Полученную культуру использовали в качестве инокулята (10 %) для засева свежей среды того же состава, продолжительность второго этапа культивирования составляла 18 часов. Выделение ДНК проводили, как описано ранее (14).

Фрагментацию геномной ДНК проводили ультразвуком с помощью устройства Covaris S220. Библиотека фрагментов ДНК длиной от 300 до 400 п.н. была подготовлена с помощью набора реагентов NEBNext Ultra II для Illumina в соответствии с инструкцией производителя. Библиотека была секвенирована дважды: на платформе Illumina HiSeq 4000 с наборами реагентов HiSeq 3000/4000 PE cluster kit и HiSeq 3000/4000 SBS kit (300 циклов), а затем на платформе Illumina HiSeq 2500 с наборами HiSeq rapid PE cluster kit v2 и HiSeq rapid SBS kit v2 (500 циклов) в соответствии с инструкцией производителя.

Предварительную обработку чтений, сборку и анализ генома проводили, как описано (14), со следующими модификациями. Удаление адаптеров проводили при значении параметров: ktrim, r; k, 23; mink, 11; hdist, 1; tpe; minlen, 20; и ref, adapters. Удаление частей ридов, имеющих низкое качество, было проведено при значении параметров: qtrim, r; trimq, 15; и minlen, 20. Полученные контиги отбрасывали, если их длина составляла <500 п.н. Парное сходство между последовательностями гена 16S рРНК определяли с использованием программы TaxonDC 1.3 (15).

В результате секвенирования было получено  $5,5 \times 10^6$  парноконцевых чтений длиной 251 п.н. (2,7 млрд. п.н.) и  $2,2 \times 10^6$  парноконцевых чтений длиной 151 п.н. (0,66 млрд. п.н.), 88% оснований имеют показатель качества более Q30. Полученные после предварительной обработки  $7,6 \times 10^6$  (3,26 млрд. п.н.) парноконцевые чтения были собраны в 46 контигов с 433-кратным покрытием. N50 составляет 504440 п.н., а длина самого длинного контига – 688257 п.н. Размер генома составляет 7,55 млн. п.н. со средним содержанием G+C пар 71,4%. Всего было предсказано 6658 белок-кодирующих генов (1062 из которых являются гипотетическими белками), 53 тРНК, 13 полных или частичных рРНК, 3 нкРНК и 2 массива CRISPR. Как и ожидалось, в геноме штамма ВКМ Ас-666<sup>Т</sup> были обнаружены гены катаболизма стероидов.

В настоящее время вид *S. hirsuta* включает подвиды *hirsuta* и *kobensis* (<http://www.bacterio.net/>). В то же время штамм *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>T</sup> (MN515057.1) имеет только 98,59% сходства с последовательностью гена 16S рРНК штамма *S. hirsuta* subsp. *kobensis* JCM 9109T (EU267029.1). Значения ANI и dDDH, рассчитанные для последовательностей генома штаммов ВКМ Ас-666<sup>T</sup> (VWRH01000000) и DSM 44795T (QBKV01000000), составили 89,47% и 39,9%, соответственно, что значительно ниже пороговых значений (95–96% ANI и 70% dDDH) для разграничения видов (16-18). Эти данные, а также различия на фенотипическом уровне (19, 20) указывают, что подвиды *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* и *S. hirsuta* subsp. *kobensis* следует повысить до уровня видов *S. hirsuta* и *S. kobensis*, соответственно.

Данные биоинформатического анализа полного генома *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>T</sup> являются основой для дальнейшего изучения функционирования генов, продуктов экспрессии генов, регуляции метаболизма стероидов у термофильных актинобактерий, а также открывают перспективы для модификации метаболических путей и создания эффективных биокатализаторов, способных производить ценные биоактивные стероиды.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 18-14-00361).

#### Литература

1. Afzal M, Al-Awadhi S, and Oommen S. 2013. Br Biotechnol 3(4):581–591. [http://www.journalrepository.org/media/journals/BBJ\\_11/2013/Sep/1378361318-Afzal342013BBJ4516.pdf](http://www.journalrepository.org/media/journals/BBJ_11/2013/Sep/1378361318-Afzal342013BBJ4516.pdf)
2. Littlechild J, Novak H, James P, and Sayer C. 2013. in: Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. 481–507. DOI: 10.1007/978-94-007-5899-5\_19
3. Wiegel J, Ljungdahl LG, Demain AL. 1985. Crit Rev Biotechnol 3(1):39–108. DOI: 10.3109/07388558509150780
4. Smith KE, Williams RAD, Sideso O. 1992. FEMS Microbiol Lett 92(1):29–34. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05229.x
5. Sideso O, Williams RA, Welch SG, Smith KE. 1998. Steroid Biochem Mol Biol 67:163–169. DOI: 10.1016/s0960-0760(98)00101-0
6. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. 2007. Biocatal Biotrans 25(1):43–50. DOI: 10.1080/10242420600906330
7. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. 2005. Steroids 70(4):327–333. DOI: 10.1016/j.steroids.2004.12.003
8. Al-Tamimi S, Al-Awadi S, Oommen S, Afzal M. 2010. Int J Food Sci Nutr 61(1):78–86. DOI: 10.3109/09637480903292619
9. Sodano G, Trabucco A, DeRosa M, Gambacorta A 1982. Experientia 38(11):1311–1312. DOI: 10.1007/BF01954920
10. Lacey J, and Goodfellow MJ. 1975. J Gen Microbiol 88(1):75–85. DOI: 10.1099/00221287-88-1-75
11. Kollerov VV, Monti D, Deshcherevskaya NO, et al. 2013. Steroids 78:370–378. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.12.010
12. Lobastova TG, Khomutov SM, Shutov AA, et al. 2019. Appl Microbiol Biotechnol 103(12):4967–4976. DOI: 10.1007/s00253-019-09828-6
13. Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Шутов А.А., с соавт. Сб тез IV Пушинской школы-конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. 2017. С. 77.

14. Poshekhontseva VY, Bragin EY, Fokina VV, et al., 2019. *Microbiol Resour Announc* 8(24): pii:e00510-19. DOI: 10.1128/MRA.00510-19
15. Tarlachkov SV, Starodumova IP. 2017. *JBG* 3:1–4. DOI: 10.18454/jbg.2017.3.5.1
16. Richter M, Rossello-Mora R. 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126–19131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106
17. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, et al. 2013. *BMC Bioinformatics* 14:60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60
18. Chun J, Oren A, Ventosa A, et al. 2018. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:461–466. DOI: 10.1099/ijsem.0.002516
19. Iwasaki A, Itoh H, Mori T. 1979. *J Antibiot (Tokyo)* 32:180–186. DOI: 10.7164/antibiotics.32.180
20. Kim SB, Goodfellow M. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology, the Actinobacteria, part B, vol 5*. Springer, New York, pp. 1392–1410.

## **Исследование структуры микробного сообщества в фито-очистных сооружениях с различными технологическими схемами**

*<sup>1,2</sup>Харитонов С.Л., <sup>1,2</sup>Щеголькова Н.М., <sup>2</sup>Рыбка К.Ю.*

<sup>1</sup>Факультет Почвоведения, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,  
г. Москва

<sup>2</sup>Институт Водных Проблем РАН, г. Москва

### **Введение и актуальность**

Фито-очистные сооружения (ФОС) являются природно-техногенным барьером для разного рода загрязняющих веществ и патогенных микроорганизмов [1, 2]. Эти сооружения в силу значительного времени пребывания сточной воды в них (более 5 суток) имеют преимущества в разложении органических токсикантов. Ветланды с вертикальным потоком двухступенчатой очистки (в разных модификациях французской системы) наиболее эффективны для очистки коммунально-бытовых стоков и не образуют токсичного осадка сточных вод [3].

Применение современных микробиологических методов продемонстрировало, что в разложении органических токсикантов в ФОС участвуют не одиночные виды микроорганизмов, а микробные сообщества (МС), характеризующиеся наличием большого количества сложных эколого-трофических связей между отдельными таксонами. Однако, на данный момент накопленных данных по таксономическому разнообразию микробиома очистных сооружений недостаточно для выделения ключевых групп микроорганизмов, участвующих в разложении ксенобиотиков. Эти данные позволят решить такие задачи как оптимизация структуры сообществ или селекция наиболее эффективных вариантов сообществ. Это крайне важно для ускорения процесса запуска таких сооружений и вывода их на стабильное функционирование.

Моделью для исследования сукцессий микробного сообщества ФОС могут служить сооружения разного года запуска, построенные по одной технологии для одного типа, находящиеся в одной климатической зоне.

### **Результаты**

Исследование проводилось на четырех разновозрастных фито-очистных сооружениях с вертикальным потоком, очищающим коммунально-бытовые стоки. При этом два сооружения были построены по классической «Французской системе», а другие два – включали дополнительный этап преобработки сточных вод (AZOE<sup>®</sup>): Saint Boil (STB,

2018 год, Французская система), Saint Helene (Helen, 2007 год, Французская система), Saint Desert (Desert, 2016 год, AZOE), Vercia (Ver, 2003 год, AZOE). Обе системы включают 2 стадии, каждая из которых представлена вертикальным подповерхностным ветландом. Поступающие воды проходят их последовательно [3]. Образцы отбирались в феврале 2019 года с прикорневой зоне на каждой стадии, в пяти повторностях. Эффективность работы сооружений оценивалась по отношению принятых в производственном мониторинге характеристик во входящих и выходящих из сооружения водах ( $BOD_5$ , COD,  $N_{total}$ ,  $P_{total}$ ). При помощи высокопроизводительного секвенирования 16s rRNA было определен таксономический состав Бактерий и Архей на обеих стадиях.

Нитрифицирующие бактерии относящиеся к филумам Nitrospira и Chloroflexi найдены во всех сооружениях, кроме самого молодого (STB). На этом сооружении значительную долю сообщества составляли цианобактерии и представители рода *Zooglea*, в то время как на других они были представлены незначительно. Археи, принадлежащие к Thaumarchaeota, обнаружены в более старых сооружениях (Helen, Ver), а в молодых практически не встречались (Desert, STB). Наибольшее биоразнообразие наблюдается на самом молодом сооружении (STB), наименьшее – на сооружении Helen. Обнаружено также, что в стабильно функционирующих сооружениях биоразнообразие микроорганизмов значительно падает при переходе от первой стадии ко второй. Это правило не соблюдается на самом молодом сооружении (STB) и на самом старом (Ver) – здесь биоразнообразие обеих стадий сопоставимо.

### **Обсуждение**

Широкая представленность нитрифицирующих бактерий (Chloroflexi, Nitrospira), как на первой так и на второй стадии коррелирует с данными химического анализа и свидетельствует о том, что процессы нитрификации стабильно и эффективно протекают в сооружениях вертикального типа. В то же время денитрификация, как процесс чувствительный к содержанию доступного органического вещества, протекает не столь эффективно и часто является лимитирующим процессом при удалении общего азота в подобных сооружениях. Денитрифицирующие бактерии были обнаружены во всех сооружениях, наибольшее их количество, причем с существенным отрывом, в сооружении Helen. Эта разница обусловлена неожиданно высокой представленностью одного вида *Pseudomonas caeni*, при этом, трех других сооружений доли денитрификаторов, примерно равны. Таким образом, корреляции между долей денитрифицирующих бактерий и эффективностью удаления азота нами не обнаружено.

Снижение общего биоразнообразия микроорганизмов при переходе от первой стадии ко второй объяснимо, так как на первой стадии удаляется существенная часть органического вещества и биогенных элементов, то есть обедняется субстрат для роста микроорганизмов в дальнейшем. В самом молодом сооружении (STB) это правило не соблюдается, по-видимому, из-за того, что система в целом на момент отбора образцов (менее года с момента постройки сооружения) не успела стабилизироваться и не произошла селекция микроорганизмов. В этом же сооружении наблюдается наибольшее количество уникальных видов. Тот факт, что биоразнообразие на второй стадии не падает на самом старом сооружении (Ver), может быть связан с накоплением автохтонного органического вещества в этом сооружении. Снижение «специализации» биоценоза при увеличении биоразнообразия может приводить к снижению эффективности очистки от азота в целом, что подтверждается данными химического анализа: в сооружениях STB и Ver наблюдается низкая эффективность удаления общего азота (Ver – 71%, STB – менее 60%). Полученные данные, безусловно, требуют дальнейшего анализа, однако уже сейчас заметны корреляции между структурой микробного сообщества очистного сооружения и эффективностью протекающих в нем биохимических процессов деградации загрязняющих веществ и удаления биогенных элементов.

## Литература

1. Рыбка К.Ю., Щеголькова Н.М. Фито-очистные системы как природно-техногенные барьеры для загрязняющих веществ. 2019. Издательский дом: ВОДА: ХИМИЯ И ЭКОЛОГИЯ Москва, ISBN 978-5-9909335-7-6, 256 с.
2. Florent Chazarenc, Vincent Gagnon, Elif Asuman Korkusuz. Treatment of pollution in constructed wetlands: from the fundamental mechanisms to the full-scale applications. *Environmental Science and Pollution Research*. September 2015, Volume 22, Issue 17, pp 12775–12778
3. В Kim, M Gautier, S Prost-Boucle, P Molle, P Michel, et al.. Performance evaluation of partially saturated vertical-flow constructed wetland with trickling filter and chemical precipitation for domestic and winery wastewaters treatment. *Ecological Engineering*, Elsevier, 2014, 71, pp.41-47.

### **Изменение популяции дрожжей ржаной хлебной закваски при длительном ведении**

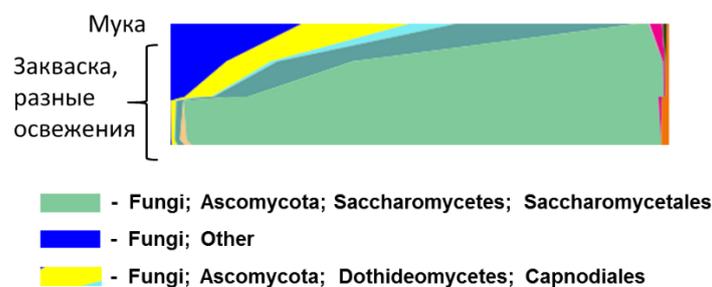
<sup>1,2</sup>*Хлесткин В.К.*

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский филиал ФГАНУ Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности, г. Санкт-Петербург; dir2645@yandex.ru,

DOI: 10.18334/ibpm2019\_231-232

Хлебная закваска с химико-биологической точки зрения представляет собой биополимерную гидроколлоидную матрицу с развивающимся в ней микробным сообществом, чаще всего включающим в себя дрожжи и молочнокислые бактерии. Несмотря на важность этого полуфабриката для человечества, процессы, происходящие в нем, до сих пор до конца не изучены, хотя представляют определенный интерес с точки зрения поиска новых штаммов микроорганизмов и их биологически активных метаболитов. Между тем, в литературе имеются данные, что дрожжевой состав закваски зависит от условий ее ведения, в частности, температуры. При этом эволюция бактериальных сообществ в заквасках, ведомых при одинаковых температурах, не обязательно следовала по единому пути и изменения в доминантных и субдоминантных бактериальных сообществах происходили даже после шести недель обновления [1]. В данной работе проводится изучение динамики изменений микробиома и метаболома, происходящих в ржаных заквасках при их длительном ведении (до 86 освежений). Для исследования дрожжевого метагенома ржаной закваски были приготовлены ампликонные библиотеки фрагментов ITS последовательности рибосомального оперона с праймерами, специфичными для грибного биома, проведен анализ нуклеотидной последовательности полученных ПЦР фрагментов методом высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina для тотальной ДНК, выделенной при обработке образцов разводного цикла и после разного числа циклов освежения. Показано, что в отличие от бактериологического состава, грибной состав закваски довольно быстро стабилизировался и оставался практически неизменным на протяжении производственного цикла в 86 освежений с доминированием дрожжей *Saccharomyces*.



*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-016-00085). Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.*

## Литература

1. Bessmeltseva, M., Viiard, E., Simm, J., Paalme, T., & Sarand, I. (2014). Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation. PLoS ONE, 9, 4, e95449.

## Микробиологическая характеристика ферментативной основы «Буза» как перспективного функционального напитка

<sup>1,2</sup>Хусаинова А.Ф., <sup>3</sup>Бикмурзина З.Р., <sup>3</sup>Шакирова И.А., <sup>3</sup>Фазылова Д.А.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» Минобрнауки РФ,

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный нефтяной технический университет»; г. Уфа; zakirova.zu@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_232-234

В ходе исследования выяснена микробиологическая характеристика кисломолочного напитка «Буза», что позволяет научно обосновать напиток как биологически активный продукт.

Современная пищевая биотехнология базируется на применении микробиологических и биохимических процессов, обеспечивающих получение высококачественных продуктов питания, одновременно обладающих лечебно-профилактическими свойствами [4,5]. Наиболее востребованными среди них являются ферментативные продукты, содержащие лакто- и/или бифидобактерии [6]. Это связано с тем, что молочнокислые бактерии, являющиеся представителями нормальной микрофлоры кишечника, обладают антагонистической активностью по отношению к гнилостным бактериям, продукты жизнедеятельности которых могут оказывать токсическое воздействие на организм человека. Указанное преимущественно связывают с выработкой указанными микроорганизмами молочной кислоты и некоторых других факторов, что является неблагоприятно сказывается на росте, в том числе, патогенных микроорганизмов [2,7,8].

Одним из давно известных, но недостаточно изученных до настоящего времени, слабоалкогольных напитков является «Буза» («Боза»). Этот кисломолочный продукт относят к хлебным напиткам. Он имеет густую консистенцию и сладкий вкус. Процессу ферментации (брожения) на этапе его приготовления подвергается какой-либо зерновой продукт (просо, пшеница, гречка, или овсяная мука). «Бузу» находилась в широком употреблении в Крыму, на Кавказе, в Средней Азии и на Балканах. География этого напитка нашла свое отражение в исключительном разнообразии рецептов его

приготовления [1]. В частности, на территориях, населявшихся башкирами для производства национального диетического напитка «Буза башкирская» преимущественно использовали кумысную закваску, микробиологическая основа которой охарактеризована недостаточно.

Целью исследования стало изучение микробиологии кисломолочного напитка «Буза» и выделение кисломолочных бактерий, используемых в качестве ферментативной основы, для научного обоснования его перспективности в качестве биологически активного продукта.

Для выделения действующего микробиологического начала из кисломолочного напитка «Буза» использовали среду Лурия-Бертани и Brain Heart Infusion Broth («Difco», США). Для получения изолированных колоний применяли «Лактобакагар» (ГНЦ ПМБ, Россия). Температурный оптимум культивирования составил +37°C. В результате проведенных исследований в анаэробных условиях была выделена чистая культура молочнокислых гетероферментативных грамположительных палочковидных бактерий, которые по культуральным, тинкториальным и биохимическим признакам была отнесена к роду *Lactobacillus* [3].

Методом масс-спектрометрии была идентифицирована культура *Lactobacillus fermentum*. Наибольшая всхожесть имела место на MRS Agar (HiMedia, Индия). По культуральным признакам выделенная культура *L. fermentum* характеризовалась образованием белых, выпуклых, гладких колоний с ровными краями диаметром 3-5 мм, и была представлена грамположительными полиморфными палочками, способными ферментировать глюкозу, в-галактозу, лактозу, сахарозу, сорбит и мальтозу.

Для оценки биологических свойств была проведена серия исследований выделенной культуры *L. fermentum* в отношении тестовых штаммов *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*. Однако *in vitro* антагонистическую активность выявить не удалось.

Так как одним из компонентов в рецептуре напитка «Буза» является мед, *in vitro* была исследована всхожесть выделенной культуры *L. fermentum* при использовании в составе питательной среды различных медовых добавок (5 видов меда: лесной, донниковый, гречишный, липовый, гречишно-липовый). В результате проведения этого эксперимента обнаружилось, что наилучший рост *L. fermentum* из напитка «Буза» был показан на средах с добавлением липово-гречишного меда. Значительно хуже культура *L. fermentum* культивировалась на среде, содержащей лесной мед.

Полученные данные о свойствах выделенной культуры *L. fermentum* может использоваться в дальнейшем для разработки новых кисло-молочных продуктов.

#### Литература

1. Алкогольные напитки древности [Электронный ресурс]. – URL : <http://s30556663155.mirtesen.ru/blog/43487988366/Alkogolnyie-napitki-Drevney-Rusi> (дата обращения : 06.06.13).
2. Вахитов Т.Я. Концепция пробиотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты // журн. Микробиологии, иммунологии и эпидемиологии. 2005. - № 5. - с. 108-114.
3. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл// Бюллетень сибирской медицины № 4. 2003. С. 50-58
4. Закирова З.Р., Сенченко О.В. Kombucha в производстве функциональных напитков брожения. В сборнике: качество продукции, технологий и образования материалы XIII международной научно-практической конференции. 2018. С. 133-136.

5. Кочеткова А.А. Функциональные продукты в концепции здорового питания / Пищевая пром-сть. - 1999. № 3. - с. 4
6. Макушин А.Н. Влияние сортовых особенностей проса на качество слабоалкогольного напитка "Буза". Известия самарской государственной сельскохозяйственной академии. Изд.: СГСА. По материалам сайта: <https://elibrary.ru>
7. Хуснарязанова Р.Ф., Очилова Р.А., Масыгутова Л.М., Баширова Р.М. Влияние национального напитка "Буза" на микробиоценоз кишечника. Материалы III Международной конференции по восстановительной медицине (реабилитологии), Изд.: Златограф, 2000. По материалам сайта: <https://elibrary.ru>
8. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Коллектив авторов. Тверь, 2016.

### **Антимикробная и фунгицидная активность 2-амино-тиазолов, содержащих дитерпеновый фрагмент**

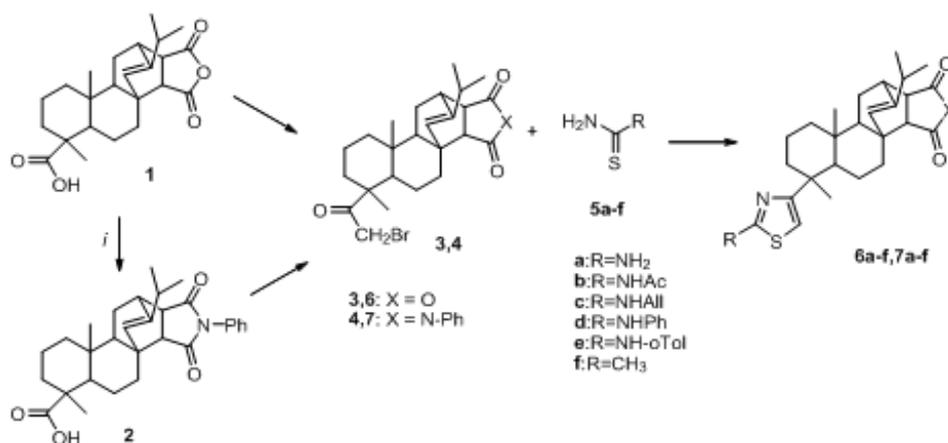
*<sup>1</sup>Хуснутдинова Н.С., <sup>1</sup>Мещерякова С.А., <sup>1</sup>Шумадалова А.В.,  
<sup>2</sup>Султанова Р.М.*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Башкирский Государственный Медицинский Университет, Уфа

<sup>2</sup> Уфимский Институт химии УФИЦ РАН, г. Уфа; [nelly.husnutdinova@gmail.com](mailto:nelly.husnutdinova@gmail.com),  
DOI: 0.18334/ibpm2019\_234-236

Аминотиазолы являются структурными фрагментами биологически активных соединений обладающих противовоспалительной, психотропной, антибактериальной, фунгицидной, противовирусной активностями [1]. Они используются для разработки лекарственных препаратов в медицинской химии из-за сходных свойств с тиомочевинной, и склонны к регуляции биологических мишеней. Поэтому в последнее время все большее внимание уделяется синтезу этого класса гетероциклов. Особый интерес вызывают аминотиазолы, содержащие в качестве заместителя фрагменты природных соединений, это связано с тем, что растительные метаболиты широко используются как структурно-уникальные строительные блоки для создания новых лекарств [2].

В настоящей работе исследована антимикробная активность 2-амино-1,3-тиазолов, содержащих дитерпеновый фрагмент, полученных путем химической модификации малеопимаровой кислоты (МПК) **1** и N-фенилиимидмалеопимаровой кислоты **2** по карбоксильной функции без изменения дитерпенового каркаса (схема 1).



В результате проведенного скрининга установлено, что МПК **1** и ее производные содержащие 2-амино-тиазольный фрагмент в концентрации 50 мкг/мл ингибировали жизнедеятельность исследованных штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий, низших грибов *C. albicans* (табл. 1).

Выраженной противомикробной (МИК 0,39 – 12,5 мкг/мл) и противогрибковой (МИК 0,195 – 0,78 мкг/мл) активностью обладали производное МПК **6c** и 2-фенилмалеопимаримида **7e**, содержащие в положении 6, соответственно, 2-*N*-аллиламино- и 2-*N*-(*o*-толил)аминотиазольный фрагмент. Однако в отношении синегнойной палочки соединение **6c** проявило слабую противомикробную активность (МИК 50 мкг/мл).

На основании полученных данных можно выявить связь между строением производных МПК и активностью. Так замена в молекуле МПК карбоксильной группы на 2-аминотиазольный фрагмент или наличие *N*-фенилимидного фрагмента за счет модификации ангидридного цикла не приводит к усилению противомикробной и противогрибковой активности. Среди производных МПК с *N*-замещенными 2-аминотиазольными фрагментами в положении 6, наиболее активно соединение, имеющее *N*-аллильный радикал **6c**, а в случае малеопимаримида **7e** наличие *o*-толуидинового заместителя приводит к появлению выраженной противомикробной и противогрибковой активности в отношении исследованных тест-культур.

Табл. 1. Противомикробная и противогрибковая активность синтезированных производных МПК

соединение	Минимальная ингибирующая активность (МИК), мкг/мл								
	<i>St. aureus</i>	<i>Str. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Ent. aerogenes</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. albicans</i>
<b>1</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>2</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>3</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>6a</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>6d</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50

<b>6с</b>	3,12	3,12	6,25	6,25	1,56	12,5	50	6,25	0,78
<b>6е</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>7а</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>7д</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>7б</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>7е</b>	0,39	0,39	0,78	1,56	0,39	1,56	0,39	1,56	0,195
миконазол	-	-	-	-				-	25
нистатин	-	-	-	-				-	7,8
флюконазол	-	-	-	-				-	1.0
амфотерец- ин В	-	-	-	-				-	0,39
гентамицин	0.78	-	-	-	0,39		0,78	-	
канамицин (МИК <sub>90</sub> )	2.0	-	16	-	32		>128	-	

Полученные результаты показывают перспективность продолжения поиска новых противомикробных и противогрибковых лекарственных средств в ряду производных малеопимаровой кислоты и малеопимаримида, структура которых принципиально отличается от известных антибактериальных препаратов.

#### Литература

1. Kashyap S.J., Garg V.K., Sharma P.K., Kumar N., Dudhe R., Gupta J.K. // Med. Chem. Res. 2012. V. 21. № 8. P. 2123.
2. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и соавт. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / М.: Гриф и К, 2012; с. 944.
3. Толстикова Г.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э., Толстикова С. Е., Хвостов М. В., Смоляные кислоты хвойных России. Химия, фармакология, 2011, 395 с.

### **Влияние липопептидов *Bacillus subtilis* на компоненты про-антиоксидантной защитной системы растений пшеницы в норме и при инфицировании возбудителем септориоза**

***Черепанова Е.А., Белобородова А.Н.\*, Максимов И.В.***

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, DOI: 10.18334/ibpm2019\_236-237

\* Башкирский Государственный Университет г. Уфа; k\_cherpanova@mail.ru

Виды *Bacillus* представляют собой аэробные спорообразующие бактерии, которые широко распространены и встречаются повсеместно. Бактерии рода *Bacillus* знамениты своими способностями синтезировать широкий спектр биологически активных веществ.

Среди последних большой интерес представляют липопептиды - поверхностно-активные вещества, обладающие антибиотическими свойствами по отношению ко многим патогенным микроорганизмам [1], а, кроме того, способные запускать в растениях механизмы системной индуцированной устойчивости [2]. Липопептиды представляют собой низкомолекулярное соединение из пептида с «хвостом» жирной кислоты.

Целью нашего исследования было выявить влияние липопептидов, выделенных из среды культивирования *Bacillus subtilis* Ts1, Ts8-2, 26Д, 11ВМ на устойчивость пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Berk, который обнаруживается практически во всех пшеничных ценозах. Этот фитопатогенный гриб относится к числу широко распространенных и опасных по экономическим последствиям в современных условиях болезней зерновых культур [3; 4]. Мы использовали листья 6-суточных проростков пшеницы, предобработанных растворами липопептидов, предварительно выделенных из среды культивирования *B. subtilis*. Наиболее эффективные в плане защиты пшеницы от септориоза концентрации липопептидов были подобраны в отдельном эксперименте. Через 24 часа после обработки листья инфицировали спорами фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk ( $10^6$  спор/мл). На 3 сутки после инфицирования определяли активность пероксидазы, каталазы и концентрацию перекиси водорода в пересчете на мг белка. Визуальные признаки развития септориоза на листьях пшеницы, предобработанных липопептидами, оценивали на 7 сутки после инфицирования.

Визуальные признаки развития септориоза на листьях пшеницы, предобработанных липопептидами оценивали на 7 сутки после инфицирования. Об изменениях, происходящих при этом в про-/антиоксидантной системе растений пшеницы судили, оценивая ферментативную активность пероксидазы, каталазы и концентрацию перекиси водорода в пересчете на мг белка.

Выявлено, что предобработка листьев пшеницы липопептидами, полученными из штаммов *B. subtilis* Ts 8-2, 26 Д и 11ВМ в 1,5-2 раза повышает концентрацию перекиси водорода в растениях и дополнительно увеличивает концентрацию перекиси при инфицировании. Инфицирование непредобработанных липопептидами листьев при этом снижает количество перекиси водорода в них, благодаря, вероятно, действию каталазы, активность которой несколько увеличивается при этом. Интересно отметить, что в инфицированных листьях, предобработанных липопептидами, концентрация перекиси водорода была несколько выше, чем в неинфицированных. Каталазная активность в них так же была выше, что может свидетельствовать об интенсивных процессах, направленных на защиту растительных тканей от гриба. Пероксидазная активность в инфицированных листьях, предобработанных липопептидами *B. subtilis* Ts1 и Ts8-2 была выше, чем в неинфицированных, в то время как в необработанных липопептидами инфицированных листьях она снижалась. Площадь инфицирования листьев, предобработанных липопептидами, во всех случаях была ниже на 50-70%, чем в необработанных. Меньше всего площадь инфицирования нами наблюдалась в листьях, предобработанных *B. subtilis* Ts1.

Таким образом, нами выявлено, что обработка липопептидами из *B. subtilis* оказывает значительное влияние на компоненты про-/антиоксидантной системы, стимулируя защиту растений от патогена, что проявлялось в меньшей площади некротических пятен на листьях растений. Выраженность защитных реакций растений зависела от вида бактерии из которой был выделен липопептид. Полученные результаты могут помочь в разработке биопрепаратов для растениеводства.

*Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-29-08014.*

## Литература

1. Dimkic' I., Stankovic' S., Nišavic' M., Petković M., Ristivojević P., Fira D, Berić T. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 925
2. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Липопептиды эндофитов и фитоиммунитет: перспективы практического использования// Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 57-61.
3. Пыжикова Г.В. Септориоз зерновых культур – Москва: ВНИИТЭИСХ, 1984, 65 с.
4. Санин С.С., Назарова Л.Н. Фитосанитарная обстановка на посевах пшеницы в Российской Федерации // Защита и карантин растений, 2010, № 2, с. 69–79.

## Моделирование процесса биосинтеза лизина на крахмальной среде в лабораторных условиях на лабораторной установке Biostat A Plus

<sup>1,2</sup>Шевченко А.Р., <sup>1</sup>Пушкина А.В., <sup>1</sup>Бовыкина Г.В., <sup>1</sup>Холопов Н.С.

<sup>1</sup> Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,

<sup>2</sup> ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова РАН, Институт комплексных исследований Арктики,  
г. Архангельск; schewchenko.aleks@yandex.ru, DOI: 10.18334/ibpm2019\_241-243

L-лизин является незаменимой аминокислотой, необходимой для полноценного питания, как человека, так и сельскохозяйственных животных, широко используется в качестве кормовой добавки для свиней и птицы. В растительных кормах – кукурузе, пшенице и ячмене – низкое содержание лизина, и для повышения эффективности корма требуется добавление отдельных аминокислот, в первую очередь, L-лизина.

Промышленное производство L-лизина происходит путем микробиологической ферментации с использованием бактерий *Corynebacterium glutamicum*, одного из промышленно важных микроорганизмов в производстве аминокислот. Поскольку L-лизин имеет большое значение и мировой рынок растет, постоянно прилагаются усилия, направленные на улучшение процессов ферментации L-лизина, включая разработку более эффективных производственных штаммов, улучшение процессов ферментации (перемешивание, подача O<sub>2</sub>, температура и pH), оптимизации среды (концентрация сахара, питательных веществ, витаминов, пеногасителя) и поиск новых источников углерода. Для производства L-лизина используют непрерывный процесс ферментации с периодическими подпитками [1, 2].

Актуальной задачей является подборка и обеспечение оптимальных условий микробиологического синтеза лизина и анализ режима работы ферментера, учета важных параметров, с целью повышения продуктивности продуцента [1]. Лабораторные условия позволяют проводить исследования на совершенствование технологии культивирования штамма *Corynebacterium glutamicum*, а также факторов, влияющих на синтез лизина при использовании различных углеводных источников.

Целью данной работы являлось апробация методики культивирования продуцента лизина [3] с использованием крахмала в качестве источника углерода в периодическом режиме с подпитками на лабораторном биореакторе Biostat A Plus.

### Материалы и методы

#### 1) Продуцент лизина

Использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* E-531 ВКПМ В-1959. Культуру готовили путем многократного разбавления клеток в пробирке с физраствором до бактериологического стандарта 5 (500 млн клеток). Затем из пробирки перенесли 100 мкл культуры в 10 мл среды LB. Колбу инкубировали в шейкере-инкубаторе BIOSAN ES-20/60 24 ч при температуре 30 °С и 210 об/мин. Через сутки перенесли 1 мл культуры

в колбу с отбойниками со 100 мл среды LB. Инкубировали на шейкере при температуре 30 °С и 210 об/мин 24 ч. Оптическая плотность готового инокулянта – не менее 0,2 ед, отсутствие посторонней микрофлоры проверяли методом Грама.

## 2) Среда и параметры для культивирования

Культивирование проводили в лабораторном ферментере «Biostat A plus» (SARTORIUS, Германия). Источник углерода при производстве лизина – гидролизат кукурузного крахмала, полученный в ходе ферментативного гидролиза с помощью амилолитических ферментов  $\alpha$ -амилазы Aquazym (2,5 кг/т крахмала) и глюкоамилазы Duozyme (1 кг/т крахмала) – препараты компании Novozymes (Дания). В качестве источника ростовых факторов использовали гидролизат пшеничного глютена (5 г в 70 мл 8 %  $H_2SO_4$ ). Объем среды 500 мл имел следующий состав: крахмальная патока – 150 мл (200 г/л); гидролизат глютена – 40 мл; дрожжевой экстракт – 1,2 г;  $(NH_4)_2SO_4$  – 9 г;  $KH_2PO_4$  – 0,6 г;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,3 г;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,006 г;  $MnSO_4 \times 4H_2O$  – 0,006 г; никотинамид – 0,0035 г; тиамин – 200 мкл (50 мг/мл); биотин – 0,0035 г; дистиллированная вода – 350 мл; пеногаситель – 1 мл. Кислотность среды регулировали щелочью, pH 6,8-7,0. Среду в ферментере стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 30 минут. Полученный посевной материал 150 мл переливали стерильно через асептический соединитель в жидкую питательную среду.

При культивировании продуцента в ферментере «Biostat A plus» с помощью программного обеспечения задавали следующие параметры:  $t = 30$  °С; pH 6,8-7,5; 400-600 об/мин в течение 52 ч [3]. Во время процесса культивирования осуществляли контроль параметров ежечасно. Периодически вносили подпитки: азотную, гидролизат крахмала (содержание 200 г/л глюкозы) и гидролизат глютена по мере исчерпывания их в среде.

## 3) Мониторинг динамики содержания бактерий, глюкозы и лизина в культуральной жидкости.

Каждые два часа проводили отбор проб, культуральную жидкость отбирали из ферментера через пробоотборник. Отобранные пробы культуральной жидкости подвергали контролю морфологических признаков роста бактерий на жидкой среде по характерной ярко-желтой окраске, и проверяли отсутствие посторонней микрофлоры методом Грама. Определяли концентрацию клеток в культуральной среде путем промывки и лиофильного высушивания остатка. Контроль содержания остаточной глюкозы определяли в пробе после центрифугирования глюкозооксидазным методом на анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра». Содержание лизина определили методом капиллярного электрофореза согласно ГОСТ 31480-2012 [4].

## Результаты

При визуальном микроскопическом исследовании культуральной жидкости клетки штамма *S. glutamicum E-531* представляли собой скопление грамположительных палочек, типичных для *Corynebacterium glutamicum*.

На рис. 1 представлена динамика роста концентрации клеток в процессе культивирования штамма на гидролизате крахмала. Первые 10 часов в результате активного потребления глюкозы (рис.2) и азота из среды наблюдается увеличение концентрации клеток. После 10 часов концентрация сахара понижается, рост биомассы культуры останавливается. После внесения подпиток, культура вновь активизируется и после 40 часов культивирования наступает фаза отмирания. На рис.2 представлена тенденция по уровню содержания глюкозы в культуральной среде.

После 48 часов наблюдалось замедление положительной динамики роста концентрации клеток, ферментацию остановили. Конечный объем культуральной жидкости – 1,053 л.

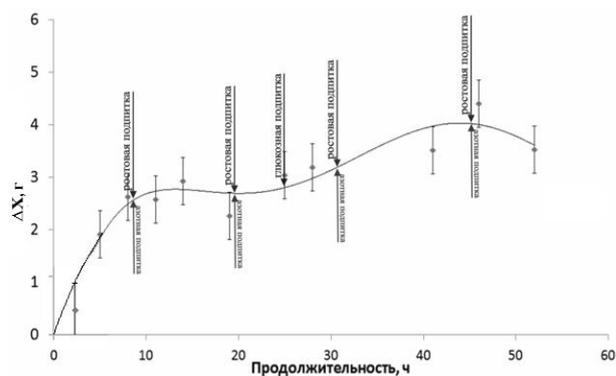


Рис. 1. Динамика роста концентрации клеток в процессе культивирования

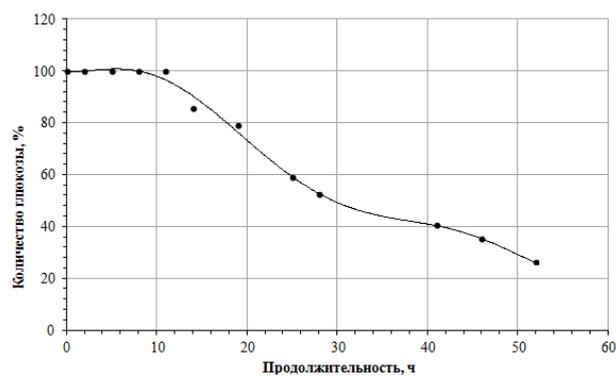


Рис. 2. Ассимиляция глюкозы в процессе культивирования

В процессе ферментации происходит накопление в культуральной среде лизина — оптимизируется процесс центрального метаболизма (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса), путь биосинтеза целевого продукта и экспорт аминокислоты из клеток в культуральную жидкость. Содержание лизина в последней отобранной пробе составило 3,3 г/л лизина (рис. 3).

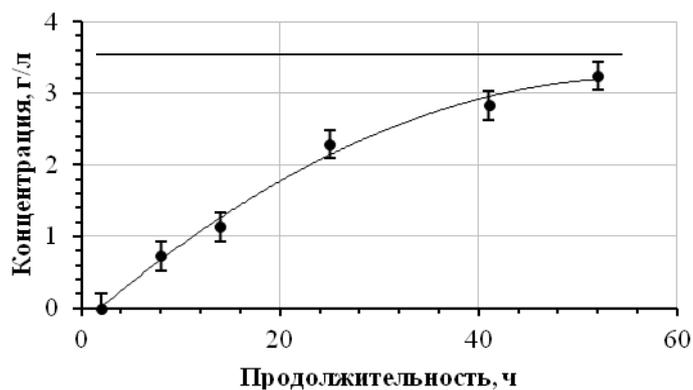


Рис. 3. Содержание L-лизина в культуральной жидкости

### Выводы

В работе на лабораторном ферментере Biostat A Plus был подобран и изучен микробиологический синтез лизина на крахмальной патоке, полученной ферментативным способом. Гидролизат крахмала экономически выгодный для ферментативных процессов углеводов, так как позволяет при использовании малого количества ферментов получить высокую концентрацию сахара — 200 г/л.

В течение 52 часов штамм-продуцент *C. glutamicum E-531* ассимилировал около 75% глюкозы от исходного количества. Коэффициент конверсии сахара при этом составил 0,18, что свидетельствует о корректности подобранных параметров культивирования, поставленной методике и возможности биосинтеза лизина на лабораторной установке Biostat A Plus данным методом.

Авторы выражают благодарность НИЦ Курчатовский институту – ГосНИИгенетике (Москва) за предоставленный штамм *Corynebacterium glutamicum E-531*.

Исследования были выполнены в рамках гранта Молодые ученые Поморья (проект № 07-2019-02a).

## Литература

1. T. Brautaset, Lysine Industrial Uses and Production. / Brautaset T., Ellingsen T. E., Eggeling L. // Reference Module in Life Sciences. – 2017. – 14 p. – doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.09172-x.
2. Получение лизина на основе продуктов глубокой переработки зерна: лабораторный регламент ЛР-00479942-1-2011 / ФГИУ ГосНИИгенетика. – М., 2011. – 35 с.
3. Шевченко А.Р. Опыт биосинтеза лизина штаммом *Corynebacterium glutamicum e-531* в лабораторном ферментере «Biostat A Plus» на мелассной среде/ Шевченко А.Р., Пушкина А.В., Бовыкина Г.В. // Ломоносовские научные чтения студентов, аспирантов и молодых ученых ВШЕНиТ-2019. – 2019. – С.104-110.
4. ГОСТ 31480-2012. Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания аминокислот (лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана) методом капиллярного электрофореза (с Поправкой). – Введ. 2013.07.01. – М.: Стандартинформ, 2012. – 28 с.

### **Характеристика новых ферментов с фосфоноацетальдегид гидролазной активностью у бактерий-деструкторов глифосата рода *Achromobacter***

*Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.*

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;  
г. Пушкино; epiktetoff@gmail.com, DOI: 10.18334/ibpm2019\_241-243

Фосфоноацетальдегидгидролаза (фосфонатаза, ЕС 3.11.1.1) – наиболее известный фермент катаболизма природных органофосфонатов (ОФ), таких как 2-аминоэтилфосфоновая кислота (2-АЭФ). Фосфонатаза катализирует расщепление С–Р связи (углерод-фосфор) молекулы фосфоноацетальдегида (ФАА) в ацетальдегид и ортофосфат. Этот фермент был впервые обнаружен у бактерии-деструктора 2-АЭФ – *Bacillus cereus*, затем выделен у *Salmonella typhimurium* и *Pseudomonas aeruginosa* и считается относительно хорошо изученным. Фосфонатаза представляет собой гомодимер с молекулярной массой (ММ) субъединицы около 32 кДа, активный в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ , в диапазоне значений рН 8–9, с относительно высоким сродством к субстрату ( $K_m=0,033$  мМ) и высокой максимальной скоростью реакции ( $V_{max}=29,7$  Ед./мг белка). В литературе приведены косвенные данные о возможности существенного структурного и функционального разнообразия фосфонатаз у разных таксонов бактерий, но систематического изучения данного вопроса не проводилось. Однако в последнее время опубликован ряд научных работ, допускающих участие этого фермента в катаболизме не только природных, но и синтетических ОФ, среди которых наиболее распространен гербицид глифосат (ГФ, N-фосфонометилглицин) – средство для борьбы с однолетними и многолетними сорными растениями. В некоторых странах мира ГФ признан канцерогенным соединением, по современным данным он также способен оказывать негативное воздействие на репродуктивную функцию, сердечно-сосудистую и мочеполовую системы животных и человека. Поэтому в настоящее время в научном сообществе возрос интерес к изучению метаболизма этого соединения.

На сегодняшний день описано 2 пути биоразложения ГФ посредством бактериальных ферментных систем: 1) особая ГФ-специфичная С–Р лиаза и 2) ГФ-оксидоредуктаза. Имеются предварительные экспериментальные и литературные данные о том, что у ряда штаммов-деструкторов, таких как *Ochrobactrum anthropi* ГРК3 и

*Achromobacter aegrifaciens* Kg 16, терминальную стадию ГФ-оксидоредуктазного пути утилизации ГФ, связанную с непосредственным гидролизом С–Р связи, могут катализировать ферменты с фосфоацетальдегидгидролазной активностью, то есть фосфонатазы.

Ранее нами были выделены и очищены до электрофоретически гомогенного состояния 9 белков с фосфоацетальдегид гидролазной активностью из бактерий-деструкторов ГФ. Целью настоящей работы является подробная биохимическая характеристика выделенных ферментов в сравнении с литературными данными. Продуцентами новых ферментов являются 6 штаммов рода *Achromobacter*, способные использовать ГФ в качестве единственного источника фосфора и экспрессирующие фосфонатазу при росте на среде с ГФ. У трех штаммов (*A. insolitus* Kg 19, *A. aegrifaciens* Km 11А и *A. aegrifaciens* Km 11В) было впервые обнаружено по 2 изоформы фосфонатазы в пределах одной клетки. Все выделенные белки существенно отличались от описанных в литературе ферментов по кинетическим характеристикам и субъединичному составу. Большинство белков представляли собой мономеры с ММ около 60 кДа, кроме фосфонатаз у *A. aegrifaciens* Km 11 и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II), которые представляли собой гомодимеры с ММ 25 и 30 кДа соответственно. Фосфонатазы *A. aegrifaciens* Kg 16, *A. insolitus* Kg 13, *A. insolitus* Kg 19 (изоформы I и II), *A. aegrifaciens* Km 11В (изоформы I и II), *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II) проявляли относительно низкое сродство к субстрату (ФАА) и низкую максимальную скорость гидролиза ФАА по сравнению с фосфонатазами, описанными в литературе. Относительно высоким сродством к субстрату обладали фосфонатазы *A. aegrifaciens* Km 11 ( $K_m=0,44$  мМ ФАА,  $V_{max}=0,28$  Ед./мг белка) и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа I), где  $K_m=0,114$  мМ,  $V_{max}=0,258$  Ед./мг белка. Кинетическая кривая реакции гидролиза ФАА ферментами штаммов *A. aegrifaciens* Km 11 и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II) не описывались уравнением Михаэлиса-Ментен и имела S-образную форму с точкой перегиба. Такой тип кривой характерен для аллостерических ферментов, где взаимодействие активных центров, связывающих лиганд в молекуле фермента, протекает так, что сродство к лиганду растет по мере насыщения связывающих центров в молекуле фермента. Поэтому расчет значений  $K_m$  и  $V_{max}$  проводился по уравнению Хилла. Фосфонатаза бактерии *A. aegrifaciens* Km 11 обладала положительной кооперативностью ( $n=1,54$ ), что говорит о высоком сродстве к лиганду. Наоборот, изоформа II фосфонатазы штамма *A. aegrifaciens* Km 11А проявляла отрицательную кооперативность ( $n=0,55$ ), что соответствовало данным о низком сродстве к субстрату в отличие от изоформы I этого же штамма.

Ферменты также отличались по диапазонам оптимальных значений рН и термостабильности. Так, большинство фосфонатаз у *Achromobacter* имели весьма узкий оптимум рН 7,2–7,6. Максимальная фосфонатазная активность у большинства очищенных белковых препаратов наблюдалась при температуре 40 °С, исключение составляли фосфонатазы бактерий *A. insolitus* Kg 13, *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформы I и II) и *A. aegrifaciens* Km 11В (изоформа I), у которых температурный оптимум составлял 45 °С. Активность очищенных ферментных препаратов наилучшим образом сохранялась в условиях заморозки при температуре -40 °С. Ингибиторный анализ новых ферментов также продемонстрировал их существенные отличия от описанных ранее фосфонатаз. Так, ГФ и 2-АЭФ выступали конкурентными ингибиторами, соответственно, изоформ I и II фосфонатаз *A. insolitus* Kg 19, в то время как в литературе для фосфонатаз известен только один конкурентный ингибитор – борогидрид. Эти же соединения, а также аминометилфосфонат и глутатион, могли являются активаторами других изученных нами фосфонатаз.

Таким образом, впервые показано существенное разнообразие фосфонатаз у представителей одного рода бактерий *Achromobacter*. Отличия в ММ, субъединичном

составе и кинетических характеристиках, а также в наборе активаторов и ингибиторов позволяет говорить об обнаружении новых, ранее не описанных в литературе ферментов с фосфоноацетальдегидгидролазной активностью, не тождественных ранее изученным фосфониатазам.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №18-74-00021.*

## **Аусталиды V и W – новые меротерпеноиды из гриба *Aspergillus ustus*: структура и противоопухолевая активность**

<sup>1</sup>Антипова Т.В., <sup>2</sup>Зайцев К.В., <sup>2</sup>Опруненко Ю.Ф., <sup>3</sup>Жеребкер А.Я.,  
<sup>1,4</sup>Рыццов Г.К., <sup>1,4</sup>Земскова М.Ю., <sup>1</sup>Желифонова В.П., <sup>1</sup>Иванушкина Н.Е.,  
<sup>1</sup>Козловский А.Г.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
г. Пушкино; DOI: 10.18334/ibpm2019\_243-244

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

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Сколково

<sup>4</sup>Московский областной университет, г. Москва;  
tantipova@ibpm.pushchino.ru, zaitsev@org.chem.msu.ru

Аусталиды – вторичные метаболиты, впервые обнаруженные у грибов рода *Aspergillus*. По своему химическому строению эти соединения относятся к меротерпеноидам. В настоящее время известно около 30 аусталидов, различающихся модификацией основного каркаса и его заместителями. Эти метаболиты обладают разнообразной биологической активностью (антибактериальной, антивирусной и др.). Для некоторых из них установлена ингибирующая транскрипционная активность онкогенного ядерного фактора AP-1 в нецитотоксических концентрациях и ингибирование фермента альфа-глюкозидазы, что перспективно для разработки методов лечения сахарного диабета (Zhuravleva et al., 2014).

Целью данной работы было установление структуры двух новых метаболитов, относящихся к аусталидам, выделенных из гриба *Aspergillus ustus* ВКМ F-4692, и изучение их противоопухолевой активности.

Штамм *Aspergillus ustus* ВКМ F-4692 был получен из ВКМ ИБФМ РАН, выделен из строительного камня Московского Кремля. Гриб культивировали в среде Чапека поверхностным способом в течение 21 сут. После экстракции культуральной жидкости хлороформом выделение индивидуальных соединений проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Химическая структура соединений была установлена с использованием ряда современных физико-химических методов: масс-спектрометрии высокого разрешения, ЯМР спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (в том числе COSY, HMQC, NOESY) и литературных данных для аусталидов A и D (Antipova et al., 2019). Абсолютная конфигурация была определена с помощью КД-спектроскопии. Установлено, что основной структурной особенностью обоих соединений является наличие тетрагидрофуранильного кольца (**G**), впервые обнаруженного у аусталидов (Рис.). Новые метаболиты получили названия аусталид V и W. Аусталид V отличается от аусталида W наличием ацетокси группы (Рис.)

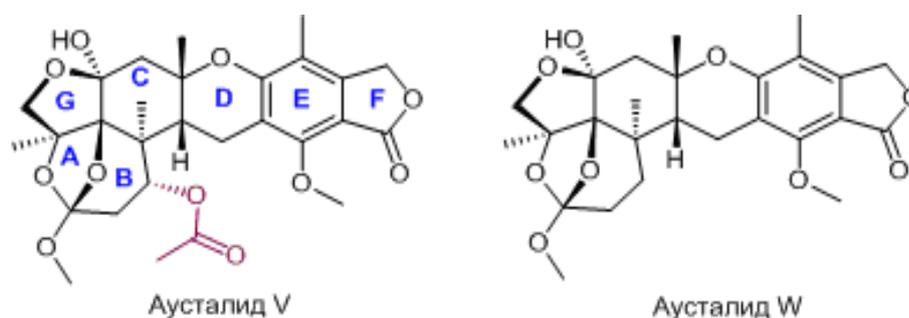


Рис. Структуры новых аусталидов

С целью определения биологической активности аусталидов были использованы культивируемые клетки человека и новая технология измерения жизнедеятельности клеток xCELLigence. Было показано, что аусталиды V и W способны ингибировать рост клеток рака простаты LNCaP, DU145 и рака мочевого пузыря T24. Клетки T24 и DU145 имели более низкую чувствительность к обоим веществам по сравнению с клетками LNCaP. Оба соединения значительно ингибировали миграцию клеток LNCaP с одинаковой активностью 8.9  $\mu\text{M}$  для аусталида V и 8.8  $\mu\text{M}$  для аусталида W.

Для определения возможных клеточных «мишеней» чувствительных к действию аусталидов был использован Human Phospho-kinase Array (R&D systems). Массив полученных данных показал, что обработка аусталидом W (50  $\mu\text{M}$ ) клеток LNCaP приводит к снижению фосфорилирования ряда компонентов сигнального пути АКТ-mTOR: АКТ1/2/3, PRAS40, mTOR и p70S6 киназ. Также наблюдалось снижение фосфорилирования тирозинкиназы c-Src, фокальной адгезионной киназы FAK и уровня белка теплового шока 60 (HSP60). Все эти факторы являются позитивными регуляторами клеточной миграции и клеточного цикла. Следовательно, способность аусталида W ингибировать сигнальный путь АКТ-mTOR, а также активности онкогенных киназ FAK, Src и белка HSP60, может объяснить наблюдаемое снижение роста и миграции опухолевых клеток.

*Исследования масс-спектрометрии высокого разрешения финансировалась Российским научным фондом, грант №18-79-10127.*

#### Литература

1. Zhuravleva OI, Sobolevskaya MP, Leshchenko EV, Kirichuk NN, Denisenko VA, Dmitrenok PS, Dyshlovoy SA, Zakharenko AM, Kim NY, Afiyatulloev SS. *J Nat Prod.* 2014; 77: 1390–1395. doi: 10.1021/np500151b
2. Antipova T.V., Zaitsev K.V., Oprunenko Y.F., Zhrebker A.Ya, Rystsov G.K., Zemskova M.Y., Zhelifonova V.P., Ivanushkina N.E., Kozlovsky A.G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2019; 29: 126708 doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126708

### **Метаболом и фитопатогенность сибирских штаммов грибов *Heterobasidion annosum sensu lato***

<sup>1</sup>Желифонова В. П., <sup>1</sup>Антипова Т. В., <sup>2,3</sup>Литовка Ю. А., <sup>2,3</sup>Павлов И. Н.,  
<sup>1</sup>Баскунов Б. П., <sup>2,4</sup>Тимофеев А. А., <sup>1</sup>Козловский А. Г.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушино; DOI: 10.18334/ibpm2019\_244-245

<sup>2</sup>Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск

<sup>3</sup>Сибирский государственный университет науки и технологий им. М. Ф. Решетнева, г. Красноярск

<sup>4</sup>ФИЦ «Красноярский научный центр» СО РАН, г. Красноярск;  
kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Проблема корневых гнилей хвойных пород, вызываемых фитопатогенными грибами рода *Heterobasidion*, привлекает пристальное внимание из-за огромных размеров ущерба, причиняемого лесному хозяйству. К наиболее опасным и вредоносным возбудителям корневых и комлевых гнилей хвойных растений относят грибы комплекса *H. annosum sensu lato* (корневая губка). В Сибири грибы рода *Heterobasidion* представлены преимущественно видами *H. annosum* и *H. abietinum*. Наибольший вред корневая губка наносит насаждениям *Pinus sylvestris* L. в ленточных борах Минусинской котловины и Алтайского края (Pavlov, 2015; Литовка и Павлов, 2018). Эти грибы являются эндофитами, сапро-некротрофными фитопатогенами, паразитирующими на более чем двухстах видах растений. Важными факторами в патогенезе корневой губки являются ферментные системы, активно разлагающие биополимеры древесины, а также низкомолекулярные соединения. Известно, что грибы комплекса *H. annosum* s. l. способны продуцировать вторичные метаболиты – фоманнозин, фоманноксин, фомаджорины и др. Для фоманноксина и фоманнозина показана антибактериальная, антифунгальная и фитотоксичная активности. Работы по изучению видовой принадлежности изолятов корневой губки, географического места их выделения, спектра метаболитов и их биологической активности единичны (Hansson et al., 2014).

Целью данной работы было исследование биосинтеза вторичных метаболитов и фитопатогенности *in vitro* у 10 штаммов грибов рода *Heterobasidion*, выделенных из хвойных насаждений с различной степенью патологического отпада на территории Средней и Западной Сибири, а также Южной Кореи (о. Чеджу).

Штаммы были выделены в 2014-2018 гг. из плодовых тел и базидиом *Heterobasidion*, произраставших на различных хвойных породах, либо, в единичном случае, из древесины поваленного дерева с характерными признаками поражения корневой губкой. Видовую идентификацию штаммов проводили с помощью морфолого-культуральных и молекулярно-генетических методов на основе секвенирования участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha. При изучении продукции вторичных метаболитов штаммы культивировали глубинно в синтетической среде Норкранс в течении 11 сут. Для сравнения биосинтетической способности продуктивных штаммов использовали две органно-минеральные среды. Вторичные метаболиты извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией хлороформом. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля в различных системах растворителей. Идентификацию выделенных метаболитов осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками. Фитопатогенность оценивали по модифицированному методу (Olson et al., 2005).

Была установлена принадлежность исследуемых культур корневой губки к видам *H. annosum* (Fr.) Bref. (5 штаммов), *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (4 штамма) и *H. ecrustosum* Tokuda, T. Natt. & Y.C. Dai (1 штамм). В профиле метаболома трех штаммов *H. annosum* преобладал бензогидрофуран фоманноксин. Два штамма *H. annosum* синтезировали близкие по структуре к фоманноксину соединения 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид. У *H. annosum* 45-2 были идентифицированы сесквитерпен фоманнозин и его предшественники. Состав вторичных метаболитов штаммов *H. abietinum* был идентичен и характеризовался преимущественным биосинтезом фоманноксина. Состав питательной среды оказал влияние на продукцию фоманноксина. В среде Норкранс

максимум накопления отмечен у *H. abietinum* Н 1 (55 мкг/мл), на органоминеральной среде 3 у *H. annosum* 45-2 (34 мкг/мл). Все исследованные штаммы *H. annosum* и *H. abietinum* проявляли фитопатогенное действие в отношении сеянцев *P. sylvestris*, вызывая некротическое поражение и гибель растений в течение 18 сут. Показатели вирулентности штаммов *H. annosum* были выше, чем у *H. abietinum*. Максимальная вирулентность отмечена для *H. annosum* 45-2 с наибольшим разнообразием соединений в профиле метаболома и высокой продукцией фоманноксина.

#### Литература

1. Литовка Ю.А., Павлов И.Н. / Грибные сообщества лесных экосистем. Москва – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2018. Т.5. С.68-76.  
*Hansson D., Wubshet S., Olson A., Karlsson M., Staerk D., Broberg A. // Phytochemistry. 2014. V. 108. P. 243-251.*
1. Olson A., Lind M., Stenlid J. // For. Path. 2005. V. 35. P. 321–331.  
*Pavlov I.N. // Contemporary Problems of Ecology. 2015. Т. 8. № 4. С. 440-456.*