

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук»
ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный
естественно-научный институт»

**III ПУШКИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ
И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»**

5-9 декабря 2016

Материалы конференции

Пушино 2016

УДК 579.22
ББК 28.4

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов/под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2016. 168 с.

ISBN 978-5-9909335-0-7

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

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

УДК 579.22
ББК 28.4

ISBN 978-5-9909335-0-7

© Авторы тезисов, 2016
© ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Биодegradация углеводов разных классов новой ацидофильной микобактерией <i>Иванова А.Е., Канатьева А.Ю., Курганов А.А.</i>	10
Анализ микробного сообщества содово-соленых озер Пустыни Бадаин Жаран (Внутренняя Монголия) <i>Эрдынеева Е.Б., Намсараев З.Б., Раднагуруева А. А., Лаврентьева Е.В.</i>	12
Как прижизненный краситель конго красный взаимодействует с клеточной поверхностью <i>Azospirillum brasilense</i> и влияет на социальное поведение бактерий <i>Буданова А.А., Широков А.А., Гринев В.С., Матора Л.Ю.</i>	14
Восстановление эволюционной истории геномных перестроек в бактериях <i>Бочкарева О.О.</i>	15
Оценка эффективности метода инактивации карбапенемов у представителей семейства <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Журавлев В.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В.</i>	16
Влияние салициловой и жасмоновой кислот на каталазную активность и концентрацию перекиси водорода в суспензии эндофитных бактерий рода <i>Bacillus</i> <i>Черепанова Е.А., Благова Д.К.</i>	18
Изучение симбиотического взаимодействия бобовых трав в агроэкосистемах Белгородской области <i>Соболь Т.С., Бородаева Ж.А., Беспалова Е.Н.</i>	19
Геохимические процессы, вызываемыми бактериями цикла превращений азота в почве <i>Шкуронат М.Н., Гуля Н.И., Сорокина Е.Ф., Сиротин А.А.</i>	20
Разложение углеводов в почве под действием препарата «Биорос» <i>Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Башкин В.Н.</i>	22
Определение индуктора 6-аминогексаноаттрансаминазы у бактерий-деструкторов капролактама и олигомеров нейлона <i>Arthrobacter sp.</i> BS2 <i>Акатова Е.В., Сырова Д.С.</i>	24
Формирование гетерогенных биоматериалов на основе инкапсулированных в модифицированные кремнеземы клеток микроорганизмов в условиях золь-гель синтеза <i>Лаврова Д.Г., Рыбочкин П.В., Каманина О.А.</i>	25
Выделение и очистка фермента алкогольоксидазы из дрожжей <i>Hansenula polymorpha</i> NCYC 495 <i>ln</i> , определение констант Михаэлиса для выделенного фермента <i>Зайцева Д.Ю., Зайцев М.Г.</i>	27
Эффективность цианобактериальной инокуляции семян при выращивании растений гороха в почвах, загрязненных медью <i>Горностаева Е.А., Домрачева Л.И., Казакова Д.В.</i>	29
Анализ генетического разнообразия клинических штаммов <i>Acinetobacter baumannii</i> на территории России, Беларуси и Казахстана по данным SNP-типирования <i>Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Склеенова Е.Ю., Трушин И.В., Коннова С.А.</i>	31

Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса путем создания экспрессирующих конструкций на основе плазмиды <i>pJN105</i> <i>Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х.</i>	33
Структурно-временная сукцессия биоценоза активного ила городских очистных сооружений <i>Конорова Ю.С., Балымова Е.С., Ахмадуллина Ф.Ю.</i>	34
Биодиагностика активного ила, формирующегося на сточных водах содержащих тяжелые металлы <i>Балымова Е.С., Ахмадуллина Ф.Ю.</i>	35
Биодиагностика активного ила, формирующегося на сточных водах, содержащих тяжелые металлы <i>Сотников А.В., Сироткин А.С., Балымова Е.С.</i>	37
Продукция внеклеточной лакказы бактериями родов <i>Azospirillum</i> и <i>Niveispirillum</i> <i>Пономарева Е.Г., Купряшина М.А., Никитина В.Е.</i>	38
Влияние лектинов азоспирилл на некоторые метаболические характеристики растительной клетки <i>Аленькина С.А., Романов Н.И., Никитина В.Е.</i>	40
Продуцирование экзополисахарида кефирана лактобактериями микробного консорциума кефирной закваски <i>Потороко И.Ю., Калинина И.В., Ботвинникова В.В.</i>	42
Биосинтез наночастиц металлов под действием экстрактов морфоструктур <i>Lentinus edodes</i> <i>Лощинина Е.А., Ветчинкина Е.П., Купряшина М.А., Буров А.М., Никитина В.Е.</i>	43
Влияние замещенных 2Н-хромен-2-онов на плодоношение высших грибов <i>Цивилева О.М., Кофтин О.В., Ибрагимова Д.Н., Федотова О.В.</i>	45
Микробный биосенсор для оценки нового реагента очистки воды феррата калия <i>Зарубина А.П., Перфильев Ю.Д., Сорокина Е.В.</i>	47
Получение и исследование состава клеточной стенки <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> ВКМ Ас-1988 ^Т <i>Дин Фань, Юдина Т.Г., Потехина Н.В.</i>	49
Ростстимулирующее действие цианобактерий на декоративные культуры <i>Трефилова Л.В., Зыкова Ю.Н., Короткова А.В.</i>	51
Почвенные цианобактерии альгологической коллекции АСССИ: морфология, филогения и экология <i>Темралеева А.Д.</i>	53
Моделирование роста грибного мицелия с помощью клеточного автомата <i>Шумилов А.С., Благодатский С.А.</i>	54
Протекторные свойства гуминовых кислот и их влияние на рост микроорганизмов <i>Горовцов А.В., Андриянов А.И., Празднова Е.В.</i>	56
Микроорганизмы подземных вод, загрязненных нитратами и радионуклидами <i>Бабич Т.Л., Сафонов А.В., Назина Т.Н.</i>	58

Создание генно-инженерной конструкции на основе <i>rol</i> -генов <i>Agrobacterium rhizogenes</i> для получения косматых корней методом биобаллистической трансформации <i>Симахина А.С., Ясыбаева Г.Р., Гуменко Р.С., Саргалиева Г.М., Баймиев А.Х.</i>	60
Особенности динамики титра колифагов нормофлоры гусят в первые семь недель жизни <i>Скобляков Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.</i>	62
Особенности динамики титра <i>E. coli</i> нормофлоры гусят в первые семь недель жизни <i>Скобляков Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.</i>	62
Морфологический анализ сальмонеллезных бактериофагов <i>Чугунова Е.О., Сузина Н.Е.2, Зимин А.А.</i>	63
Краткая характеристика новых нитевидных бактериофагов, обнаруженных в фаголизате, обогащенном сальмонеллами серотипа <i>Choleraesius</i> <i>Чугунова Е.О., Сузина Н.Е., Зимин А.А., Прохорова Т.С.</i>	65
Применение мультилокусного тандемного филогенетического анализа для идентификации природных изолятов и коллекционных культур грибов <i>Василенко О.В., Иванушкина Н.Е., Стародумова И.П., Кочкина Г.А., Данилогорская А.А., Озерская С.М.</i>	67
Влияние комбинированных магнитных полей на магнетотактные бактерии <i>Хохлова Г.В., Архипова О.В., Филатова И.Ю., Вайнштейн М.Б.</i>	70
Влияние растительных масел на синтез арахидоновой кислоты <i>Mortierella alpina</i> <i>Миронов А.А., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Камзолова С.В., Вайнштейн М.Б.</i>	72
Метод поэтапного отбора биохимических реакций для формирования заданных метаболических путей <i>Минкевич И.Г.</i>	74
Ацидотолерантные сульфатовосстанавливающие бактерии как основа - биопрепарата для профилактики и лечения ацидоза рубца коров <i>Рыжманова Я.В., Центроев З.М., Щербакова В.А.</i>	76
Анализ геномов автотрофных метаногенов, выделенных из многолетнемерзлых отложений различного возраста <i>Ошуркова В.И., Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.</i>	77
Новая психротрофная бактерия из холодного источника в Северном Прибайкалье: описание <i>Duganella psychrophila</i> sp. nov. <i>Чувильская Н.А., Дамбинова Е.Ц., Трошина О.Ю., Рыжманова Я.В., Арискина Е.В., Щербакова В.А.</i>	78
Психрофильные железовосстанавливающие бактерии из холодных источников Северного Прибайкалья <i>Захарюк А.Г., Дамбинова Е.Ц.</i>	80
Новые активности полифосфатаз <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Андреева Н.А., Личко Л.П., Трилисенко Л.В., Кулаковская Т.В.</i>	82
Влияние глюкозы на порообразование в плазматической мембране дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Валиахметов А.Я.</i>	83

Неорганические полифосфаты в условиях фосфорилирования Н ⁺ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при её активации глюкозой <i>Томашевский А.А., Петров В.В.</i>	85
<i>Trichoderma</i> cf. <i>aureoviride</i> Rifai VKMF-4268D синтезирует внеклеточный пептид - ингибитор трипсина <i>Аринбасарова А.Ю., Ашин В.В., Лауринавичюс К.С., Меденцев А.Г.</i>	86
Кинетические характеристики L-лизин α — оксидазы <i>Trichoderma</i> cf. <i>aureoviride</i> Rifai VKM F-4268D <i>Аринбасарова А.Ю., Крупянко В.И., Меденцев А.Г.</i>	88
Способ получения изолимонной кислоты с использованием рекомбинантного штамма <i>Yarrowia lipolytica</i> ACO1 в режиме отъемов-доливо <i>Алаларов Р.К., Камзолова С.В., Римович В., Моргунов И.Г.</i>	90
Влияние температуры на рост, синтез липидов и арахидоновой кислоты грибами <i>Mortierella alpina</i> NRRL-A-10995 <i>Миронов А.А., Немашкалов В.А.</i>	92
Исследование синтеза пальмитолеиновой кислоты у дрожжей <i>Степанова Н.Н., Моргунов И.Г.</i>	94
Ответ клеток <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP — деструктора бензоата — на стресс <i>Соляникова И.П., Емельянова Е.В., Полищева В.Н., Сузина Н.Е.</i>	96
Ксиланазы бактерии <i>Cellulomonas flavigena</i> : экспрессия, биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал <i>Лисов А.В., Белова О.В., Лисова З.А., Винокурова Н.Г., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Бударина Ж.И., Нагорных М.О., Захарова М.В., Шадрин А.М., Солонин А.С., Леонтьевский А.А.</i>	98
Частичная характеристика бактериальной сериновой протеиназы семейства S1A из <i>Streptomyces avermitilis</i> <i>Афошин А.С., Шадрин А.М., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.</i>	98
Структурно—функциональные особенности литических Протеаз Л1 и Л5 <i>Lysobacter</i> sp. XL1 <i>Кудрякова И.В., Тищенко С.В., Габдулхаков А.Г., Цфасман И.М., Лысанская В.Я., Васильева Н.В.</i>	99
Изучение литического потенциала <i>Lysobacter capsici</i> ВКМВ-2533 <i>Протас К.Г., Кудрякова И.В., Васильева Н.В.</i>	101
Создание рекомбинантных микобактерий, продуцирующих тестостерон <i>Карпов М.В., Суходольская Г.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутлов А.А., Донова М.В., Стрижов Н.И.</i>	102
Биотрансформация станолов микобактериями <i>Довбня Д.В., Барабошкина Т.Г., Донова М.В.</i>	105
Ассоциации микроорганизмов, деградирующие твердые парафины, ароматические углеводороды и обладающие микотоксической активностью <i>Филонов А. Е., Пунтус И. Ф., Ахметов Л. И., Фунтикова Т. В.</i>	107

Трансформация актинобактериями 7(α/β)-гидроксилированных стероидных D-лактонов с 3 β -гидрокси-5-ен-структурой <i>Лобастова Т.Г., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	109
Биоконверсия 6-(N-метил-N-фенил)-аминометильных производных ряда андростана штаммом <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д <i>Суходольская Г.В., Фокина В.В., Шутов А.А., Николаева В.М., Донова М.В.</i>	111
Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой <i>Streptomyces tsukubaensis</i> <i>Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	113
Факультативно-метилотрофный фитосимбионт <i>Delftia</i> sp. Lp-1, выделенный из клубеньков люпина <i>Агафонова Н. В., Капарулина Е. Н., Федоров Д. Н., Доронина Н. В., Троценко Ю. А.</i>	116
Аэробные метилотрофные бактерии из ризосферы растений <i>Каратаева Т.А., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.</i>	117
Физиологические и филогенетические аспекты метаболизма сахарозы у термофильного метанотрофа <i>Methylocaldum szegediense</i> O12 <i>Бут С.Ю., Егорова С.В., Солнцева Н.П.</i>	120
Белок SgpR способен взаимодействовать с регуляторной областью «классического» <i>nahI</i> -оперона <i>Филатова И.Ю., Жигулев А.А., Захарова М.В.</i>	122
О причине ингибирующего влияния лёгких фракций углеводов нефти на биоту почвы <i>Шкидченко А.Н.</i>	123
Особенности выбора штаммов ризосферных псевдомонад, перспективных для создания биопрепаратов <i>Сизова О.И., Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Кочетков В.В.</i>	125
Оценка углеводородоокисляющей активности микроорганизмов Балтийского моря <i>Соколов С.Л., Сазонова О.И., Гафаров А.Б., Иванова А.А., Ветрова А.А., Кошелева И.А.</i>	127
Биоинформатический поиск генов, участвующих в деградации нафталина и салицилата в штаммах рода <i>Pseudomonas</i> <i>Фунтикова Т. В. Филатова И.Ю., Захарова М.В.</i>	129
Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти: свойства и перспективы <i>Делеган Я.А., Филонов А.Е.</i>	131
Обнаружен конститутивный промотор оперона деградации салицилата <i>Филатова И.Ю., Фролова А.А., Захарова М.В.</i>	134
Генетическая характеристика изолятов <i>Enterococcus faecalis</i> выделенных у детей при инфекциях мочевыделительной системы в Приморском крае <i>Коменкова Т.С., Шадрин А.М., Зайцева Е.А.</i>	136

Взаимное влияние элементов крови и гемолитина ii: связь экспрессии гемолитина ii и чувствительности клеток в крови различных млекопитающих <i>Ковалевская Ж.И., Бударина Ж.И., Сиунов А.В., Нагель А.С., Шадрин А.М., Винокуров М.Г., Солонин А.С.</i>	138
Роль компонентов плазмы крови человека в индукции синтеза токсина hlyii в клетках <i>V. Cereus</i> <i>Ковалевская Ж.И., Саямов В.И., Сиунов А.В., Шадрин А.М., Нагель А.С., Холод Н.С., Бударина Ж.И., Глазунова О.А., Солонин А.С.</i>	139
Процессинг и активация прокаспазы-3 протеазой S273R вируса африканской чумы свиней <i>Зражаева Д.С., Латыпов О.Р., Майоров С.Г., Третьяков К.К., Холод Н.С., Грановский И.Э.</i>	140
Изучение бактериофаговой флоры европейских зубров <i>Bison bonasus</i> (L, 1758) и американских бизонов <i>Bison bison</i> (L, 1758) (Bovinae, Bovidae, Artiodactyla) Приокского–террасного государственного заповедника <i>Зимин А. А., Никулин Н.А., Землянко В.И.</i>	141
Бактериофаговая флора очистных сооружений города Пушкино Московской области <i>Никулин Н.А., Зимин А. А.</i>	143
Улучшение каталитических свойств ЭГ2 <i>P.verruculosum</i> с помощью сайт-направленного мутагенеза <i>Вахрушева А.В., Матыс В.Ю., Беккаревич А.О., Бубнова Т.В., Доценко А.С., Рожкова А.М., Сеницын А.П., Немашкалов В.А.</i>	146
Структура эндоглюканазы 2 мицелиального гриба <i>Penicillium verruculosum</i> <i>Вахрушева А. В., Матыс В.Ю., Беккаревич А.О., Бубнова Т.В., Тищенко С.В., Габдулхаков А.Г., Доценко А.С., Рожкова А.М., Сеницын А.П., Немашкалов В. А.</i>	148
Влияние консервантов на рост и продукцию микотоксинов грибами контаминантами сыров и колбас <i>Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.</i>	150
Сравнительная оценка окисления интактными клетками, бесклеточным экстрактом и мембранными фракциями штаммов <i>Gluconobacter oxydans</i> 9.7 и <i>Gluconobacter oxydans</i> 9.4 глюкозы, этанола, ксилозы, арабинозы <i>Быков А.Г., Решетилов А.Н.</i>	152
Потребление кислорода иммобилизованными аэробными метилотрофными бактериями как подход для определения алифатических метилированных аминов <i>Кувичкина Т.Н., Гридина В.В., Капарулина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Решетилов А.Н.</i>	154
Выбор проводящего биополимера для микробного биотопливного элемента на основе клеток <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.</i>	156
Амперометрическое определение мальтозы <i>Емельянова Е.В., Решетилов А.Н.</i>	158
Модификация печатных электродов терморасширенным графитом <i>Китова А.Е., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.</i>	160

Особенности безмедиаторного переноса электронов клетками и мембранными фракциями бактерий <i>Glisopobacter oxudans</i> Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Пташник И.В., Быков А.Г., Решетилов А.Н.	162
Неорганические полифосфаты как важный компонент клеточной стенки при росте дрожжей <i>Candida maltosa</i> на гексадекане Звонарев А.Н., Рязанова Л.П., Личко Л.П., Русакова Т.Г., Колесникова С.А., Кулаковская Т.В., Дмитриев В. В.	164
Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения для контроля этапов трансформации нафталина и фенантрена ризосферными бактериями <i>Pseudomonas aureofaciens</i> Зякун А.М.1, Кочетков В.В., Захарченко В.Н., Баскунов Б.П., Пешенко В.П., Лауринавичюс К.С., Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Боронин А.М.	167

Биодеградация углеводов разных классов новой ацидофильной микобактерией

Иванова А.Е.¹, Канатьева А.Ю.², Курганов А.А.²

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

² Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

Загрязнение углеводородами природных и природно-техногенных экосистем, характеризующихся сильноокислой реакцией среды, достаточно широко распространено, что обуславливает интерес к проблеме биоремедиации подобных экстремальных местообитаний [1]. В то же время исследования микробного метаболизма углеводов сфокусированы главным образом на нейтральных условиях.

Выделено всего несколько бактериальных штаммов, способных к росту на индивидуальных углеводородах при pH ниже 4.0 и только для пяти штаммов установлен таксономический статус [1]. К настоящему времени не выяснены физиологические и молекулярные механизмы окисления углеводов при экстремально низких значениях pH. Сведения об использовании субстратов углеводородной природы ацидофильными бактериями фрагментарны и основаны на результатах тестирования их роста на одном-двух углеводородах одного класса.

В рамках продолжающихся исследований роли экстремофильных бактерий в превращениях углеводов в экстремально кислых средах серных карт Астраханского газоперерабатывающего комплекса нами выделен ряд культур аэробных углеводородокисляющих микобактерий, исследованы их биологические особенности, выявлены гены биодеградации *n*-алканов и образование био-ПАВ в процессе их роста на углеводородах [2, 3, 4]. Целью настоящей работы является выяснение катаболического потенциала новой медленно растущей ацидофильной микобактерии штамма AG_{S10}, ближайшим валидным родственником которой является *Mycobacterium florentinum* (98% сходства генов 16S рРНК) [3].

По сравнению с известными углеводородокисляющими ацидофилами исследуемый штамм отличается необычно широким спектром используемых им углеводов. Примеры изменения хроматографических профилей углеводов под воздействием штамма AG_{S10} приведены на рисунке. Субстратами для роста могут служить предельные углеводороды (алканы), в том числе с нормальной цепью атомов углерода (C₁₀–C₂₇) и в разной степени разветвленной (изо-строения) (пристан, фитан, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, сквалан). Единственным источником углерода и энергии могут быть также арены, моноароматические (толуол) и поликонденсированные (нафталин, фенантрен). Кроме того, штамм AG_{S10} способен утилизировать разнообразные алициклические углеводороды, такие как бутилциклогексан (предельный алкилзамещенный циклоалкан), циклододекан и декалин (полициклические нафтены), а также алкил-производные адамантана (каркасные углеводороды с высокой степенью конденсированности и алмазоподобной структурой), 1-метил и 1,3-диметиладамантан. Наряду с индивидуальными углеводородами разного химического строения штамм AG_{S10} осуществляет биодеградацию модельных смесей C₁₂–C₁₉ *n*-алканов и сложных углеводородсодержащих смесей (вазелиновое масло, газовый конденсат, керосин, мазут, нефть).

Результаты настоящей работы свидетельствуют об уникально широких катаболических возможностях штамма AG_{S10} в отношении углеводов, принадлежащих к разным классам химических соединений, что позволяет рассматривать его как удобную модель для изучения метаболизма этих соединений в условиях высокой

кислотности, в том числе, для поиска и анализа соответствующих функциональных генов. Для решения практических задач исследуемый штамм также представляет несомненный интерес, поскольку углеводородокисляющие ацидофилы являются потенциальными кандидатами для биоремедиации кислых местообитаний, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, непригодных для активной жизнедеятельности большинства известных углеводородокисляющих бактерий.

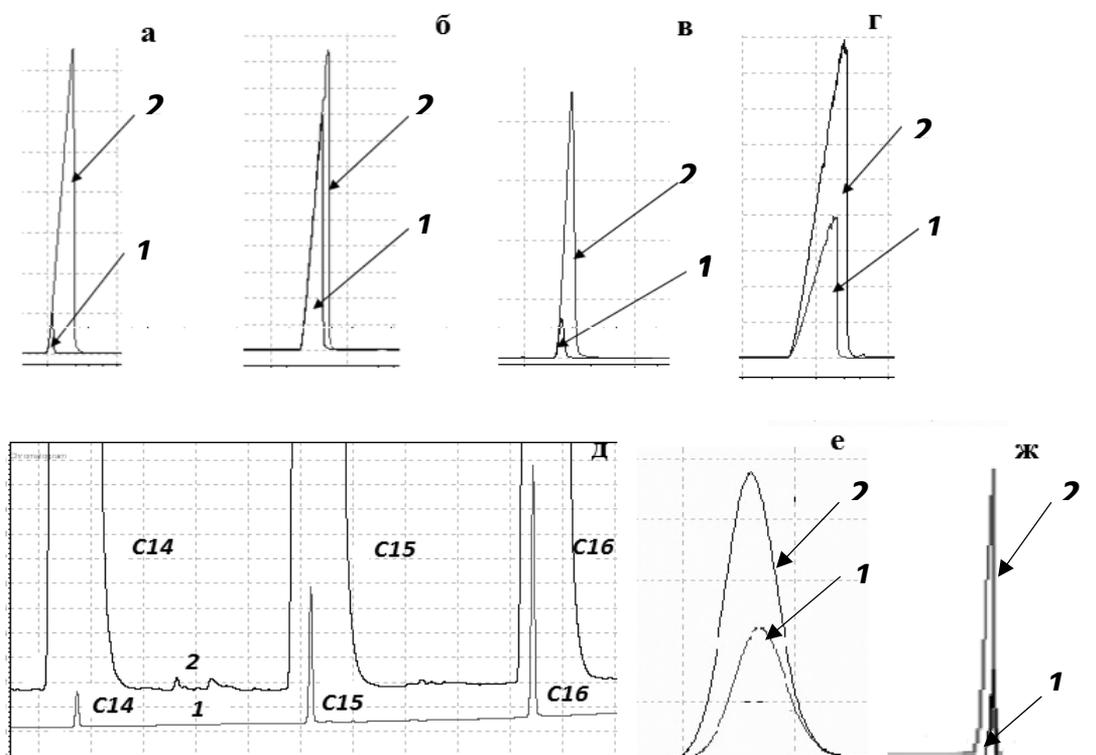


Рис. Фрагменты хроматограмм раствора в гексане *n*-трикозана (а; деструкция 96%), *n*-гексакозана (б; деструкция 38%), 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонана (в; деструкция 92%), сквалана (63%), модельной смеси C₁₄–C₁₆ *n*-алканов (д; деструкция 99.8%), 1-метиладамантана (е; деструкция 55%) и фенантрена (ж; деструкция 87%) для рабочих проб с микроорганизмами (1) и стерильных контрольных проб (2). Условия инкубации: 20 сут культивирования при pH 2.5 и температуре 30°C

Список литературы

1. Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. P. 695–700.
2. Иванова А.Е., Кизилова А.К., Канатьева А.Ю., Кравченко И.К., Курганов А.А., Беляев С.С. Окисляющая углеводороды ацидофильная термотолерантная ассоциация бактерий из серных карт // *Микробиология.* 2013. Т. 82. С. 464–472.
3. Иванова А.Е., Сухачева М.В., Канатьева А.Ю., Кравченко И.К., Курганов А.А. Углеводородокисляющий потенциал и гены биодegradации *n*-алканов новой ацидофильной ассоциации микобактерий из серных карт // *Микробиология.* 2014. Т. 83. С. 667–676.
4. Иванова А.Е., Соколова Д.Ш., Канатьева А.Ю. Биодegradация углеводородов и образование поверхностно-активных соединений ацидофильными микобактериями // *Микробиология.* 2016. Т. 85. С. 300–308.

Анализ микробного сообщества содово-соленых озер Пустыни Бадаин Жаран (Внутренняя Монголия)

Эрдынеева Е.Б., Намсараев З.Б., Раднагуруева А. А., Лаврентьева Е.В.

Лаборатория микробиологии, Институт общей и экспериментальной биологии
НИЦ «Курчатовский институт»
Отделение биотехнологии и биоэнергетики Курчатовского комплекса
НБИКС-технологий (лаборатория электробиосинтеза)

Соленые и щелочные озера представляют интерес для исследования микробного разнообразия в экстремальных условиях и являются ценным источником новых микроорганизмов [1]. Пустыня Бадаин Жаран локализована в северо-западной части Алашаньского нагорья Внутренней Монголии (Китай) и характеризуется уникальным ландшафтом, в котором сосуществуют мегадюны, с многочисленными озерами. На площади 49000 км² располагаются более 100 высокоминерализованных озер. Соленые озера пустыни являются экстремальными экосистемами и характеризуются высокими значениями солености до 495 г/л и рН до 10,63 [2].

Для исследования озер был отобран микробный мат из двух станций: 1 – Озеро Badain West (BJ 02) с рН 9,76 и соленостью 495 г/л; 2 - Озеро Nuoertu (BJ 03c) рН 9.75 и соленостью 108 г/л.

Среди идентифицированных последовательностей генов 16S рНК во всех исследуемых станциях большое число бактерий принадлежит к филуму *Proteobacteria* (Рисунок 1).

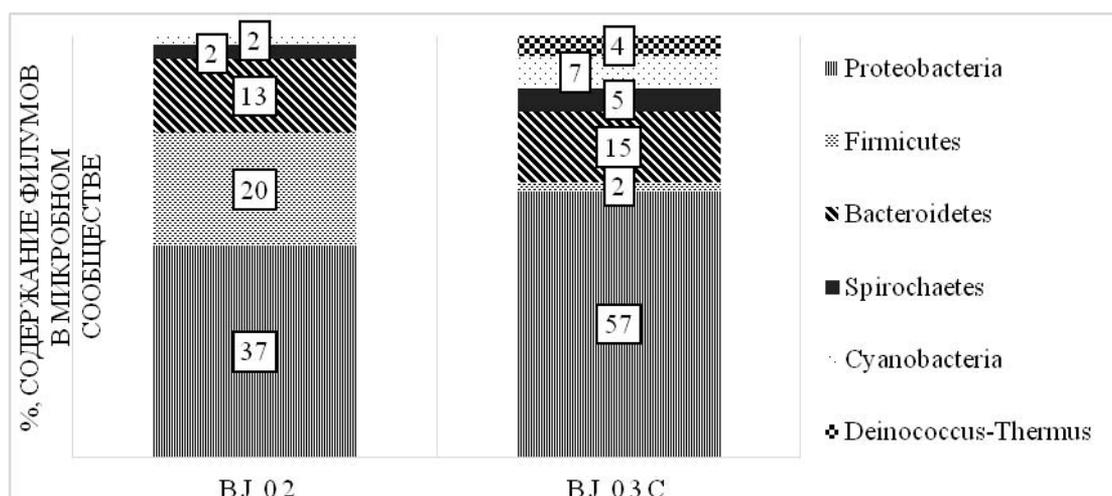


Рис. 1. Состав бактерий микробных матов озер Badain West (BJ 02) и Nuoertu (BJ 03c)

При изучении состава микробного мата было показано, что минерализация и рН играет определяющую роль в разнообразии микробного сообщества. Озеро Badain West является гиперминерализованным и тут преобладают галофильные и алкалофильные бактерии рода *Desulfonatospira* (9 %) и *Halorhodospira* (7,8 %). *Desulfonatospira* абсолютный алкалофил с оптимум рН 10 и соленостью до 25 %, осуществляют дыхание с помощью сульфата/сульфита/тиосульфата в качестве акцептора электронов, либо при автотрофном росте с помощью формиата или водорода в качестве доноров электронов [3]. *Halorhodospira* также может выдержать высокую концентрацию ионов Na⁺, рост может

осуществлять фотоавтотрофным способом и фотогетеротрофным, окисляет сульфид до серы или наоборот использует восстановленную серу в качестве донора электронов. [4].

В станции Nuortu доминируют умеренные галофилы рода *Halochromatium* (7,5 %) и *Desulfonatronum* (6,4 %). Род *Halochromatium* также является умеренным алкалофилом, оптимум pH 7,5, а оптимум солености 1,5 – 2,5 %. Пурпурные серные бактерии рода *Halochromatium*, содержат в себе бактериохлорофилла *a* и каротиноиды, которые присутствуют в качестве фотосинтетических пигментов [5]. Сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfonatronum* алкалофилы, с оптимум pH 9,5 и умеренные галофилы с оптимум хлорида натрия 3 %. В качестве акцептора электронов используют сульфаты, сульфиты и тиосульфаты [6].

Филум *Firmicutes* доминирует только на станции ВJ 02 и представлен родом *Halobacteroides* (5,8 %). Представители этого рода, являются строгими анаэробами и хемоорганотрофами. Углеводы сбраживают до ацетата, этанола, водорода и углекислого газа [7].

Филум *Bacteroidetes* в двух объектах составляет 13 и 15 %, в ВJ 02 и ВJ 03с соответственно. В станции ВJ 02 преобладает семейство *Rhodothermaceae*, бактерии которого грамотрицательные термофильные хемоорганотрофы, обладающие красным цветом из-за каротиноидов и хинона [8]. А в точке ВJ 03с наибольшее содержание грамотрицательных палочек, аэробов или анаэробов семейства *Chitinophagaceae* [9].

Филумы *Spirochaetes*, *Deinococcus-Thermus* и *Cyanobacteria* являются минорными компонентами микробного сообщества в исследуемых станциях, их количество не превышает 7 %.

Таким образом, к экстремальным условиям щелочных экосистем хорошо адаптированы галофильные и алкалофильные микроорганизмы. Также впервые с помощью секвенирования фрагментов генов 16S рРНК дана характеристика состава бактериальных сообществ в микробном мате в соленых озерах пустыни Бадаин Жаран.

Список литературы:

1. Dong H. et al. Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: Linking geochemical controls to microbial ecology // *Microb. Ecol.* 2006. Vol. 51, № 1. P. 65–82.
2. Lu Li et al. Microbial diversity of salt lakes in Badain Jaran desert // *Acta Microbiol. Sin.* 2015. Vol. 55, № April. P. 412–424.
3. Sorokin D.Y. et al. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicat* sp. nov. - A novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes // *Microbiology.* 2008. Vol. 154, № 5. P. 1444–1453.
4. Garrity G., Bell J., Lilburn T. Family I. Pseudomonadaceae // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol two The Proteobacteria, part B The Gammaproteobacteria.* 2010. 1106 p.
5. Anil Kumar P. et al. *Halochromatium roseum* sp. nov., a non-motile phototrophic gammaproteobacterium with gas vesicles, and emended description of the genus *Halochromatium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. Vol. 57, № 9. P. 2110–2113.
6. Pikuta E. V. et al. *Desulfonatronum thiodismutans* sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. Vol. 53, № 5. P. 1327–1332.
7. Whitman W.B. et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes* // Springer-Verlag New York Inc. 2012. 1-1476 p.
8. Marteinsson V.T. et al. *Rhodothermus profundus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Pacific Ocean // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. Vol. 60, № 12. P. 2729–2734.
9. Albers S.V., Siebers B. *The Prokaryotes* // *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea.* 2014. Vol. 1028. 493-495 p.

Как прижизненный краситель конго красный взаимодействует с клеточной поверхностью *Azospirillum brasilense* и влияет на социальное поведение бактерий

Буданова А.А., Широков А.А., Гринев В.С., Маторя Л.Ю.

Лаборатория иммунохимии, ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Известно, что прижизненный краситель конго красный способен адсорбироваться на бактериальных клетках, в частности, продемонстрировано его взаимодействие с углеводсодержащими полимерами бактерий рода *Azospirillum* [1, 2] и с белковыми компонентами поверхности *Escherichia coli* [3]. В работе [4] показано участие взаимодействующих с конго красным поверхностных клеточных структур в реализации социального поведения *Mucococcus xanthus* – почвенных бактерий с примитивной формой многоклеточного развития. В работе Шелудько с соавторами [5] впервые установлено, что адсорбция конго красного может приводить к подавлению роения азоспирилл и к стабильному проявлению у них способности к распространению в полужидкой среде с образованием микроколоний.

Целью настоящей работы была оценка влияния конго красного на характер распространения азоспирилл в полужидких средах методами микроскопии, а также иммунохимический и спектрометрический анализ изменений компонентов клеточной поверхности, происходящих в результате взаимодействия с красителем.

Для подавления роения бактерий и проявления у них Gri⁺-фенотипа конго красный добавляли в полужидкую культуральную среду до концентрации 37.5 мкг/мл. С помощью световой микроскопии исследованы особенности фронта распространения азоспирилл модельных штаммов Sp245 и Sp7 в полужидкой среде с добавлением и без добавления красителя. Установлено, что в среде с конго красным небольшие мобильные колонии образуются в массиве единичных клеток и, сформировавшись, покидают границы фронта роения. Методом электронной просвечивающей микроскопии были оценены изменения поверхности бактерий, выращенных в течение 3 суток в полужидкой среде в присутствии конго красного. Показано, что клетки, выращенные на среде, не содержащей красителя, имеют полярные жгутики, тогда как клетки со среды с конго красным не имеют жгутиков и покрыты слоем фибриллоподобного материала.

Методом линейного иммуноэлектрофореза с использованием специфичных антител проанализированы изменения, происходящие с липополисахаридами (ЛПС) штамма *A. brasilense* Sp245 при их росте на среде, содержащей краситель. Установлено, что выращивание бактерий в присутствии конго красного изменяет картину иммунопреципитации их ЛПС и приводит к выявлению дополнительных иммунных комплексов. При этом результаты агглютинации клеток данного штамма с анти-ЛПС антителами показали, что добавление красителя в культуральную среду приводит к частичному ингибированию агглютинации, что позволяет рассматривать ЛПС исследуемых бактерий в качестве возможного рецептора конго красного. Вероятно, блокирование красителем неких детерминант в составе ЛПС делает невозможным (или затрудняет) роение клеток, вследствие чего индуцируется Gri⁺-фенотип.

Проведен сравнительный спектрометрический анализ свободного и адсорбированного на поверхности клеток штамма Sp245 красителя с целью выяснения природы данного взаимодействия. Записаны ИК спектры лиофилизированных препаратов наружных мембран бактерий, выращенных в среде с добавлением и без добавления красителя. Отмеченные изменения спектральных характеристик позволили сделать вывод

о наличии нескольких различных по природе взаимодействий при адсорбции конго красного на поверхности бактериальных клеток, среди которых первое место занимают электростатические и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.

Список литературы:

1. Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – Vol. 165, No 2. – P. 223-229.
2. Коннова С.А., Скворцов И.М., Макаров О.Е., Игнатов В.В. Свойства полисахаридных комплексов, продуцируемых *Azospirillum brasilense*, и получаемые из них полисахаридов // Микробиология. –1994. –Т. 63, № 2. – С. 1019- 1030.
3. Hammar M., Arnqvist A., Bian Z., Olsén A., Normark S. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin - and Congo red - binding curli polymers in *Escherichia coli* K - 12 // Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 18. – No. 4. – P. 661-670.
4. Arnold J.W., Shimkets L.J. Inhibition of cell-cell interactions in *Mycococcus xanthus* by Congo red // J. Bacteriol. – 1988. – Vol. 170, No 12. – P. 5765-5770.
5. Шелудько А.В., Борисов И.В., Крестиненко В.А., Панасенко В.И., Кацы Е.И. Влияние конго красного на подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 62-69.

Восстановление эволюционной истории геномных перестроек в бактериях

Бочкарева О.О.

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, г. Москва

Для понимания механизмов эволюции необходимо проводить сравнение близких геномов и восстанавливать эволюционную историю их отношений. Традиционные методы восстановления филогении на основе сравнения последовательностей генов предполагают вертикальное наследование мутаций и сильно подвержены влиянию гомологичной рекомбинации. Данные полногеномного секвенирования показали, что порядок генов в бактериальных геномах относительно слабо сохраняется на протяжении эволюции. Однако для близких штаммов геномные перестройки, такие как инверсии, делеции и вставки, могут быть использованы для восстановления эволюционных отношений.

Мы применили алгоритмы реконструкции истории геномных перестроек к нескольким родам бактерий, таким как *Burkholderia* spp, *Yersinia pestis* and *Shigella* spp. Критерием выбора данных было наличие достаточного для анализа количества полностью секвенированных и собранных геномов и высокая пластичность геномов. Далее в работе сравнивались филогенетические деревья, полученные с помощью реконструкции различных эволюционных событий, таких как мутации в нуклеотидных последовательностях универсальных генов, изменение порядка генов на хромосоме и состав генов в геномах.

Филогенетические деревья для молодых патогенов, таких как *B. mallei*, *Y. pestis* и *Shigella* spp., построенные на сравнении последовательностей общих генов, имеют низкий уровень бутстреп-поддержки узлов, что вызвано недостаточным количеством замен на этих эволюционных расстояниях и частой гомологичной рекомбинацией между штаммами одного вида. Другой особенностью этих видов является высокая частота внутригеномной рекомбинации и, как следствие, большое количество геномных перестроек.

Было показано, что реконструкция истории инверсий позволяет разрешить узлы эволюционного дерева с низким уровнем бутстреп-поддержки. С другой стороны, традиционный филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов, позволяет различить параллельные инверсии на различных ветках эволюционного дерева по «горячим точкам» и горизонтальные переносы, содержащие инвертированные последовательности. В свою очередь, активная рекомбинация приводит к многочисленным параллельным делециям и вставкам, что не позволяет восстанавливать филогению только на основе состава геномов.

Это совместная работа с М.С.Гельфандом. Она была поддержана грантом РФФИ 16-54-21004.

Оценка эффективности метода инактивации карбапенемов у представителей семейства *Enterobacteriaceae*

Журавлев В.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В.

Лаборатория антибиотикорезистентности, Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии СГМУ, г. Смоленск
Саратовский национально-исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского (Биологический факультет)

Среди проблем, связанных с резистентностью к антибиотикам нозокомиальной микрофлоры, одной из наиболее значимых, в настоящее время, является карбапенеморезистентность у ряда грамотрицательных бактерий, в частности у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Распространенным и наиболее эффективным приобретенным механизмом резистентности является ферментативная инактивация β -лактамного кольца карбапенемазами. Группа известных на сегодняшний день карбапенемаз гетерогенна, как по структуре, так и по специфичности. Для эффективной идентификации карбапенемазной активности клиническим бактериологическим лабораториям необходим метод, сочетающий в себе простоту и быстроту исполнения, низкую стоимость, высокую точность и специфичность.

Цель: оценить эффективность использования нового фенотипического метода определения карбапенемаз – метода инактивации карбапенемов (СІМ) у клинических изолятов семейства *Enterobacteriaceae*.

Материалы и методы

Метод инактивации карбапенемов (van der Zwaluw *et al.*, 2015) основан на использовании стандартных дисков для определения чувствительности, содержащих 10 мкг меропенема и чувствительного индикаторного штамма *E. coli* ATCC®25922. Для обнаружения карбапенемазной активности диск с меропенемом инкубируют в течение 3 часов в 400 мкл суспензии клеток тестируемого микроорганизма, а затем помещают на поверхность агара, инокулированного индикаторным штаммом. При наличии карбапенемаз происходит инактивация антибиотика в диске, которая детектируется по исчезновению зоны подавления роста индикаторной культуры вокруг диска с антибиотиком.

Для исследования было отобрано 466 изолятов от госпитализированных пациентов из 29 стационаров 18 городов России. Все изоляты проявляли пониженную чувствительность к одному из трех карбапенемов: МПК имипенема ≥ 1 мг/л, МПК эртаменема и меропенема $\geq 0,125$ мг/л.

В качестве эталонного метода использовали ПЦР-анализ в режиме реального времени. Из отобранных энтеробактерий карбапенемазами различных типов обладал 101 изолят, что составило 21,7% всех микроорганизмов. Из них 76 являлись продуцентами фермента типа ОХА-48, 18 – NDM металло-β-лактамазы, один изолят обладал карбапенемазой типа КРС. Отдельную группу (n=6) составили изоляты копродуцирующие ферменты ОХА-48 и NDM. У остальных 365 микроорганизмов генов наиболее распространенных карбапенемаз не обнаружено, они выступали в качестве отрицательного контроля.

Результаты и обсуждение

По результатам тестирования 98 из 466 изолятов показали положительный результат при проведении СИМ теста, который коррелировал с данными молекулярно-генетического анализа. Один изолят *Klebsiella pneumoniae* дал ложноположительный результат. Для данного микроорганизма характерна отчетливая устойчивость к карбапенемам – МПК эртапенема, имипенема и меропенема составила 32 мг/л. Ложноположительный результат в контексте данного исследования, благодаря существованию карбапенемаз других типов, может свидетельствовать о наличии более редкого фермента у микроорганизма. Кроме того, формирование устойчивости к карбапенемам у энтеробактерий может быть обусловлено утратой поринов OmpK35 OmpK36, особенно при одновременной гиперпродукции различных β-лактамаз, таких как AmpC и ESBL. В 367 случаях результат СИМ-теста был отрицательный, из них три являлись ложноотрицательными и 364 истинно отрицательными. Для всех трех ложноотрицательных изолятов была характерна продукция NDM металло-β-лактамазы. Оценка основных показателей информативности метода инаktivации карбапенемов показала, что чувствительность и специфичность метода составили 97% и 99,7% соответственно. Прогностичность положительного результата составила 98,9% -отрицательного - 99,1%. Результаты оценки метода приведены в таблице 1.

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что метод инаktivации карбапенемов наряду с невысокой стоимостью и простотой использования, обладает высокой чувствительностью и специфичностью в отношении энтеробактерий. Данный метод с равным правом может быть использован как для подтверждения карбапенемазной активности у микроорганизма, так и для ее исключения. Очевидно, что на сегодняшний день СИМ-тест может рассматриваться как реальная альтернатива существующим фенотипическим методам, используемым в клинических и исследовательских микробиологических лабораториях.

Таблица 1

Сравнение результатов СИМ-теста с «золотым стандартом» ПЦР

	Результат ПЦР (наличие карбапенемаз)			
	Положительный	Отрицательный		
Результат СИМ-теста	Положительный	Истинно положительный TP=98	Ложноположительный FP=1	Прогностичность положительного результата PPV= TP/(TP+FP) (98+1)= 98,9%

	Отрицательный	Ложноотрицательный FN=3	Истинно отрицательный TN=364	Прогностичность отрицательного результата NPV= TN/(TN+FN) 4/(364+3)= 99,1%
		Чувствительность TPR= TP/(TP+FN) = 98/(98+3) = 97%	Специфичность TNR= TN/(TN+FP) 64/(364+1)	

Влияние салициловой и жасмоновой кислот на каталазную активность и концентрацию перекиси водорода в суспензии эндофитных бактерий рода *Bacillus*

Черепанова Е.А., Благова Д.К.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Некоторые виды бактерий способны к генерации активных форм кислорода, которые они используют для колонизации других организмов, межвидовой конкуренции и как сигнальную систему [1]. Собственную безопасность при этом бактерии обеспечивают с помощью систем антиоксидантной защиты, важная роль в которой отводится каталазе. Бактерии с отсутствием такой системы защиты обладают низкой симбиотической способностью [2]. Ранее нами было показано, что в обработанных салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами растениях пшеницы изменяется функционирование про/антиоксидантной системы, изменяется устойчивость растений к патогенным микроорганизмам [3]. В литературе описана регуляторная роль жасмонатов во взаимоотношениях растений с микроорганизмами, в том числе способность ЖК возбуждать антиоксидантную систему растений [4], однако мы не обнаружили в литературе данных по её влиянию на каталазную активность бактерий-эндосимбионтов.

В данной работе мы исследовали влияние растворов СК и ЖК (в 10^{-6} М и 10^{-7} М соответственно) на каталазную активность и концентрацию перекиси водорода в суспензионных культурах эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26Д, *B. turingiensis* 10 и 11 штаммов. Результаты показали, что *B. subtilis* 26Д характеризовался значительно более высокой активностью каталазы по сравнению с *B. turingiensis* 10 и 11 штаммами. Жасмоновая кислота в первые 3-5 часов приводила к двукратной активации каталазы в суспензии *B. subtilis* 26Д. СК значимого влияния на каталазную активность в исследуемый период не оказывала. Концентрация перекиси водорода после 18 часов инкубации *B. subtilis* 26Д с ЖК увеличивалась на треть. Интересно отметить, что на каталазу освобожденного от бактерий культурального фильтрата ЖК не оказывала какого-либо эффекта, то есть в суспензиях бактерий она влияла именно на синтез де ново и секрецию каталазы в окружающую среду.

Наши исследования показали, что ЖК у некоторых бактерий-эндосимбионтов в первые часы после внесения препарата может усиливать каталазную активность и увеличивать концентрацию перекиси водорода, выделяемые в окружающую среду. Таким образом, в инокулированных *B. subtilis* 26Д растениях пшеницы, обработанных

препаратом ЖК, наблюдаемое в ранние сроки после заражения их патогенами увеличение каталазной активности [5] может происходить в том числе и благодаря усилению секреции бактериальной каталазы под действием жасмоновой кислоты.

Список литературы

1. Steinert M., Hentschel U., Hacker J. Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction // *Naturwissenschaften*. 2000. V.87. №.1. P.1-11.
2. Visick K.L., Ruby E.G. The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase // *J Bacteriol*. 1998. V. 180. №.8. P.2087-2092.
3. Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В. Салициловая и жасмоновая кислоты в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании *Septoria nodorum* Berk. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47, N 5, 602-608.
4. Dar T. A., Uddin M., Khan M. M. A., Hakeem K. R., Jaleel, H. Jasmonates counter plant stress: a review // *Environmental and Experimental Botany*. 2015. №.115. P.49-57.
5. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль эндофитной бактерии *Bacillus subtilis* 26Д и жасмоновой кислоты в регуляции транскрипционной активности генов PR-белков в инфицированных *Septoria nodorum* Berk. растениях пшеницы // *Вестник Башкирского университета*. 2015. № 1. Т.20. С. 87-91.

Изучение симбиотического взаимодействия бобовых трав в агроэкосистемах Белгородской области

Соболь Т.С., Бородаева Ж.А., Беспалова Е.Н.

ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет»
(Институт инженерных технологий и естественных наук, биолого-химическое направление)

В настоящее время фиксация микроорганизмами азота атмосферы входит в число основных процессов, от которых зависит биологическая продуктивность. Поэтому интерес в сельском хозяйстве к данному процессу высок. Биологически связанный азот, в отличие от минерального, не требует затрат на его производство, но и дает богатую полноценным белком продукцию, не загрязняет окружающую среду, а также, способствуя повышению плодородия почвы, обеспечивает более экономное расходование азотных удобрений.

Благодаря симбиотическим взаимодействием с клубеньковыми бактериями бобовые травы играют важнейшую роль в процессе вовлечения биологического азота в агроэкосистемы.

При формировании симбиоза у партнеров возникают новые признаки, повышающие их адаптивный потенциал и способность выживать на бедных азотом почвах. Показана важная роль генов азотфиксации ризобий (*nod*, *nol*, *noe*) в бобово-ризобийном симбиозе. Ведется активное изучение молекулярно-генетических механизмов бобово-ризобийного взаимодействия; исследуют авторегуляцию клубенькообразования; эволюцию клубенькового симбиоза; особенности инфицирования и образования симбиотических структур, а также их детерминация и старение; химизм фиксации атмосферного азота и особенности функционирования мультиферментных комплексов, вовлеченных в это процесс.

Установлена перспективность отбора конкурентоспособных и эффективных местных штаммов ризобий для повышения эффективности процессов азотфиксации бобовых

культур, а также важность изучения оптимальных параметров окружающей среды для максимальной симбиотической активности и продуктивности бобовых культур. Согласно исследованиям ученых НИУ «БелГУ» на меловом юге Среднерусской возвышенности на различных типах почв оптимизации подлежат такие факторы, как наличие в почве вирулентного активного штамма ризобий, реакция почвенного раствора, влажность почвы, обеспеченность подвижными формами фосфора и обменного калия, доступными формами молибдена и бора.

Показано, что для своевременной и качественной инокуляции семян люцерны большинство почв овражно-балочных комплексов с меловыми обнажениями не содержат достаточного количества азотфиксирующих бактерий.

Важным фактором, оказывающим большое влияние на жизнедеятельность клубеньковых бактерий, а также образование клубеньков, является реакция почвенного раствора.

Установлено нежелательное воздействие низких значений рН на свойства клубеньковых бактерий. У некоторых бобовых растений образование клубеньков может происходить даже при рН_{сол.} несколько выше, чем 4,0. Отмечено наличие клубеньков у некоторых видов клевера при рН 4,2-4,5, в то же время для большинства видов клубеньковых бактерий значения рН в пределах 6,0-7,5 являются оптимальными, при рН_{сол.} 4,5-5 и 8 задерживается их рост, а при рН 3,5 погибают бактерии всех штаммов.

Таким образом, чтобы успешно возделывать бобовые культуры, нужно учитывать ряд факторов, в том числе и биологических, среди которых особое место занимают микроорганизмы. Зная состав азотфиксирующей микрофлоры представителей семейства *Fabaceae* можно повысить их урожайность, экологическую устойчивость и конкурентоспособность.

Геохимические процессы, вызываемыми бактериями цикла превращений азота в почве

Шкуропат М.Н., Гуля Н.И., Сорокина Е.Ф., Сиротин А.А.

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

Роль микроорганизмов в геохимических процессах в почве необычайно сложна и разнообразна. Последствия жизнедеятельности микроорганизмов выходят далеко за пределы колонизируемых ими почв и определяют во многом свойства осадочных пород, состав атмосферы и природных вод, геохимическую историю таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, кислород, водород, кальций, калий, железо.

Почвенные микроорганизмы оказывают прямое и косвенное влияние на образование и разрушение минералов и горных пород. При прямом разрушении микрофлора воздействует на горную породу двумя способами: ферментативно и посредством микробной слизи. При косвенном воздействии на почвообразующие породы влияют метаболические продукты микроорганизмов.

Процессы нитрификации и нитрофикации лежат в основе обеспечения культурных растений доступными формами соединений азота.

Слабая азотистая кислота в меньшей степени, а сильная азотная кислота радикальным образом влияют на растворение мелких фракций гранулометрического состава почвы, существенно изменяя его [4]. В связи с этим интенсивность процессов нитрофикации представляет определенный интерес с биологической точки зрения.

С целью определения роли нитри- и нитрофикаторов в цепи геохимических превращений в почве нами поставлена лабораторная работа «Влияние бактерий нитри- и нитрофикаторов на геохимические процессы разрушения почвенных минералов» в учебном курсе «Геохимическая деятельность микроорганизмов» для магистрантов-микробиологов. Работа включает постановку эксперимента с определением возбудителей нитри- и нитрофикации и количественным анализом содержания нитритов и нитратов в почве.

Для проведения исследования были приготовлены две среды Виноградского для нитри- и нитрофикаторов [3]. Процесс нитрификации состоит из двух фаз в интерпретации С.Н. Виноградского, (современная номенклатура первой фазы – нитрификация, а второй – нитрофикации). К средам добавляли раствор микроэлементов по Пфеннингу. На среды посев из почвы для выращивания нитри- и нитрофикаторов проводили по методике [2].

Количественное определение нитри- и нитрофикаторов проводили методом десятичных разведений с посевом на твердые питательные среды [3]. В горизонте 0...10 см выщелоченного малогумусного среднесуглинистого чернозема обнаружено $3,2 \times 10^6 \pm 0,2$ КОЕ/г нитрификаторов и $2,6 \times 10^6 \pm 0,1$ КОЕ/г нитрофикаторов, что соответствует уровню заселенности чернозема в летний период данной группой бактерий.

Качественное определение бактерий проводили, используя определитель Красильникова и некоторые тесты – методика окраски по Граму, а также определение типа дыхания, которое показало, что исследуемые организмы являются факультативными анаэробами. В ходе качественного анализа были выявлены грамотрицательные бактерии: *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*.

Мы предположили, что прямое влияние прямопропорционально интенсивности азотистой и азотной кислот. В доказательство данной версии мы определили содержание азотистой и азотной кислоты в культуральной среде и сделали пересчет на грамм почвы.

Последующий этап исследования был проведен на основании химических анализов культуральной среды: «Определение нитритов с реактивом Грисса» и «Определение нитратов с использованием дисульфифенолового реактива» [1]. При определении нитритов в пробирки приливали 10 см³ исследуемого раствора и прибавляли 0,2 г реактива Грисса. Пробирки нагревали до температуры 75 °С. Содержание нитритов определяли по степени окрашивания раствора.

Для определения нитратов готовили дисульфифениловый реактив, после чего 1 см³ анализируемого раствора приливали в пробирку и нагревали, таким образом, чтобы жидкость практически полностью испарилась. К полученному осадку добавляли 1 см³ дисульфифенилового реактива. Через 5 минут в пробирку вносили 5 см³ дистиллированной воды и оставляли стоять на 20 минут для развития окраски. По истечению указанного времени в пробирку приливали 5 см³ концентрированного раствора аммиака. В присутствии нитратов появлялось желтое окрашивание.

Концентрацию нитритов и нитратов определяли по калибровочным кривым, построенным на основе серии разбавлений. В исследуемых нами растворах было выявлено содержание NO₂⁻ ионов – 1,99 мг/дм³ и NO₃⁻ ионов – 2,8 мг/дм³ в культуральной среде, а в пересчете на 100 г почвы 19,9 мг нитритов и 28,0 мг нитратов.

Такое содержание ионов создает кислую реакцию среды, в результате чего может происходить растворение карбонатных, сульфатных, сульфидных, частично фосфатных, вплоть до калийных алюмосиликатов.

Таким образом, установленные нами концентрации азотистой и азотной кислот предположительно могут способствовать разрушению тонкодисперсной фракции перечисленных групп минералов, что может привести к изменению соотношения фракций гранулометрического состава почвы.

Список литературы

1. Методы определения нитратов и нитритов. Азотсодержащие соединения и их влияние на организмы / М.Д. Трухина // Химия: прил. к газ. «Первое сент.». – 2001. - №35. – С. 1.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие /Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
3. Микробиология: учебник для студ. высш. Учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 3-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2009. – 352 с.
4. Микрофлора почв южной части СССР/ Е.Н. Мишустин. – М.: Академия наук, изд-во «Наука», 2004. С. 246.

Разложение углеводов в почве под действием препарата «Биорос»

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

¹ Лаборатория функциональной экологии, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН

² Лаборатория почвенных циклов азота и углерода, ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН

Существенными загрязнителями системы «почва-вода» в условиях функционирования газовой и нефтяной промышленности являются газовый конденсат и нефть, представляющие собой смеси жидких углеводов разных классов (парафины, нафтены и арены). Транспортировка газового конденсата и нефти влечет за собой их значительные разливы в результате аварийных ситуаций при несанкционированной врезке в трубопроводы и их разгерметизации, вследствие гидравлического удара или коррозии. В этой связи важное практическое значение приобретает поиск и испытание средств ремедиации почв, загрязненных газовым конденсатом и нефтью, основанной на использовании для этой цели деструктурирующей способности углеводородокисляющих микроорганизмов из числа бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов, применяемых в форме препаратов, представляющих собой лиофильно высушенную (при низкой температуре и в вакууме) биомассу микроорганизмов. Испытания подобного рода новых препаратов первоначально целесообразно проводить в условиях *in vitro*, когда существует широкая возможность моделирования действия различных факторов (доз, температуры и аэрации) на разложение углеводов газового конденсата и нефти и оперативного получения необходимой информации для последующих *in situ* исследований.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании *in vitro* разложения углеводов газового конденсата и нефти в иллювиальном горизонте серой лесной почвы (Московская область) под действием препарата «Биорос». Это не случайно, так как данные вещества могут мигрировать глубоко по почвенному профилю, достигая зеркала грунтовых вод. Препарат «Биорос» был разработан на основе штаммов двух физиологических групп микроорганизмов – бактерий *Rhodococcus* sp. и дрожжей *Candida* sp. и общее их количество составляет 10^{10} кл./г. Исследование разложения углеводов газового конденсата и нефти проводили в усредненном образце почвы из слоя 50-90 см, представляющей собой по гранулометрическому составу тяжелый суглинок (рН_{H2O} 6,2). Почву обрабатывали газовым конденсатом и нефтью в дозе 50 г/кг, затем вносили в почву препарат «Биорос» (0,1 и 0,5 г/кг) в виде суспензии, получаемой путем гомогенизации в растворе аммофоски (6 г/л) и осуществляемой барботированием воздуха в течение 3 ч. Обработанные газовым конденсатом, нефтью и препаратом отдельные образцы почвы инкубировали в пластиковых емкостях (объемом 250 мл) при постоянной влажности -

70% от полной влагоемкости: первые 20 сут – при температуре +8°C, последующие 20 сут – при +18°C. Последнее было связано с имитацией годового хода температуры в исследуемом слое почвы в период май-июль.

На 10-е и 40-е сут проводили анализ содержания углеводов газового конденсата и нефти методом инфракрасной спектроскопии на концентратометре ИКН-025. С этой целью 1 г навески почвы экстрагировали 50 мл CCl₄ (5 мин) в экстракторе Экрос-8000. После отстаивания (10 мин) экстракт пропускали через хроматографическую колонку с Al₂O₃ и анализировали содержание углеводов газового конденсата и нефти на концентратометре.

Данные анализа содержания углеводорода газового конденсата и нефти были использованы для расчета времени их практически полного разложения, то есть на 99% (T_{99}) по экспоненциальной зависимости: $y = e^{-kt}$, где y - остаточное содержание углеводородов на время t , отнесенное к исходному y_0 ; e - основание натурального логарифма; k - константа скорости разложения углеводородов. Конечная формула для расчета выглядит так: $T_{99} = \ln 100/k$.

Что касается механизма микробиологического разложения углеводородов, осуществляемого, в частности, бактериями рода *Rhodococcus*, входящими в состав препарата «Биорос», заключается в поглощении веществ посредством гидрофобизации клеточной стенки, реализуемой через биосинтез специфических соединений (липофильных глико-, пептидо- и пептидогликолипидов). При прямом контакте бактерий с пленкой углеводородов, последние проникают в клетку путем пассивной диффузии, постепенно пропитывая клеточную стенку и достигают местоположения ферментов на мембранах. Наряду с молекулярно-диффузным прохождением углеводородов через поверхность всей клеточной стенки, их поступление возможно и через особые ультрамикроскопические поры. Такие каналы, заполненные электроноплотным (гранулярным) веществом, были впервые обнаружены у дрожжей: один из штаммов этой физиологической группы микроорганизмов входит в состав препарата «Биорос» в качестве активного компонента.

Между тем, исследования показали, что разложение углеводородов газового конденсата и нефти при одной и той же их дозе ускорялось с увеличением количества вносимого препарата «Биорос» от 0,1 до 0,5 г/кг, соответственно, в 2,2 и 2,8 раза (Таблица).

Таблица

Время практически полного разложения углеводородов газового конденсата и нефти в иллювиальном горизонте серой лесной почвы (Московская область) под действием препарата «Биорос»

Вариант	T_{99} , сутки	Вариант	T_{99} , сутки
Газовый конденсат (50 г/кг) + препарат «Биорос» (0,1 г/кг)	125	Нефть (50 г/кг) + препарат «Биорос» (0,1 г/кг)	171
Газовый конденсат (50 г/кг) + препарат «Биорос» (0,5 г/кг)	56	Нефть (50 г/кг) + препарат «Биорос» (0,5 г/кг)	61

Как видно из таблицы, в рассматриваемых вариантах, более интенсивно в почве шло разложение газового конденсата ($k = 0,037$ и $0,083$ сутки⁻¹), чем нефти ($k = 0,027$ и $0,075$ сутки⁻¹), что связано с меньшим содержанием в первом веществе аренов. Известно, что микробиологическому разложению более доступны парафины и нафтены по сравнению с аренами.

Таким образом, исследования *in vitro* показали очевидное преимущество подобного рода испытаний, позволяющих оперативно, за относительно короткий промежуток

времени получить необходимую информацию о препарате «Биорос». Следующий этап исследований заключается в проведении испытаний *in situ* на территориях сосредоточения объектов газовой и нефтяной промышленности, где существует наибольший риск загрязнения системы «почва-вода» при аварийных разливах газового конденсата и нефти.

Определение индуктора 6-аминогексаноаттрансаминазы у бактерий-деструкторов капролактама и олигомеров нейлона *Arthrobacter sp.* BS2

Акатова Е.В., Сырова Д.С.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет (Естественнонаучный институт)

Капролактамы и олигомеры нейлона, которые образуются при производстве полимеров на основе капролактама, являются токсичными поллютантами, представляющими опасность для окружающей среды и здоровья человека. Биodeградация капролактама и олигомеров нейлона происходит по общему биохимическому пути [1, 2].

В настоящий момент ферменты, участвующие в пути деградации капролактама, не выделены и не охарактеризованы, поэтому получение информации об этих ферментах имеет несомненную актуальность и новизну.

В данной работе изучали индуцибельность 6-аминогексаноаттрансаминазы (EC 2.6.1.-), катализирующей второй этап катаболизма капролактама и линейных олигомеров нейлона у штамма *Arthrobacter sp.* BS2.

Изучение влияния капролактама и интермедиатов пути его разложения на индукцию 6-аминогексаноаттрансаминазы включало выбор времени индукции. Тест-функцией служила активность данного фермента. В работе модифицировали методику определения активности 6-аминогексаноатаминотрансферазы [3] и применили ее для сравнительного анализа активности этого фермента в лизатах бактерий.

Для проведения индукции бактерии выращивали на богатой среде LB (Лурия-Бертани) до конца экспоненциальной фазы роста. Индукторы вносили в культуральную среду до конечной концентрации 0,02%. В ходе проведения индукции различными индукторами в течение различного интервала времени (0,5, 1, 2 часа) были рассчитаны удельные активности фермента 6-аминогексаноаттрансаминазы. Данные приведены в таблице 1.

Таблица 1

Активность 6-аминогексаноаттрансаминазы при индукции различными веществами

Индуктор \ Время индукции	Активность фермента 10^{-7} ммоль/(мин×мг)		
	0,5 часа	1 час	2 часа
контроль	не акт.	не акт.	не акт.
капролактамы	5,83	0,39	0,74
6-аминокапроновая кислота	не акт.	0,29	0,18
Адипиновая кислота	5,42	1,4	0,87

По результатам таблицы можно сказать о том, что 6-аминогексаноаттрансаминаза у данного штамма является индуцибельным ферментом. Активность фермента у данного

штамма на 1-2 порядка ниже, чем у других штаммов-деструкторов капролактама изученных ранее [4].

Наиболее приемлемыми индукторами являются: капролактама с индукцией и адипиновая кислота, а время индукции 0,5 часа. При добавлении 6-аминокапроновой кислоты и капролактама с индукцией 1 и 2 часа, удельная активность уменьшается на порядок. Таким образом, для дальнейших экспериментов по выделению и характеристике данного фермента необходимо проводить индукцию капролактамом или адипиновой кислотой в течение получаса.

Список литературы

1. Ponamoreva O.N., Esikova T.Z., Vlasova Yu.A., Baskunov B.P. and Alferov V.A. Transformation of low molecular linear caprolactam oligomers by the caprolactam degrading bacterium *Pseudomonas putida* BS394(pBS268) // Microbiology, 2010, Vol. 79, No. 3, P. 321–326.
2. Esikova T., Ponamoreva O., Baskunov B., Taran S., Boronin A. Transformation of low-molecular linear caprolactam oligomers by caprolactam-degrading bacteria // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2012. 87. 1284–1290.
3. Васильев В.Ю., Еремин В.П. Экспресс-метод определения активности γ -аминобутират- α -кетоглутарат трансминазы // Бюл. экс-перим. биологии и медицины. 1968. № 9. С. 123–125.
4. Акатова Е.В., Есикова Т.З., Понаморева О.Н. Сравнительный анализ активности 6-аминогексаноат трансминазы у бактерий-деструкторов капролактама и нового штамма-деструктора линейных олигомеров нейлона // Актуальная биотехнология. 2014. №3. С. 98–99.

Формирование гетерогенных биоматериалов на основе инкапсулированных в модифицированные кремнеземы клеток микроорганизмов в условиях золь-гель синтеза

Лаврова Д.Г., Рыбочкин П.В., Каманина О.А.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет (Естественнонаучный институт)

Инкапсулирование живых клеток микроорганизмов в инертную биологически совместимую матрицу силикагеля может обеспечить значительное преимущество при разработке микробных биокатализаторов для различных биотехнологических процессов [1]. В нашем научном коллективе проводятся исследования по получению таких биоматериалов с использованием методов золь-гель химии. Исходными соединениями для синтеза являются силановые прекурсоры, которые легко гидролизуются с последующей конденсацией гидроксилсодержащих производных. Такая схема процесса приводит к формированию пористых гелей, пригодных для иммобилизации клеток.

При использовании золь-гель технологии для получения матриц в качестве силановых прекурсоров, как правило, используют тетраалкоксисиланы. Жесткая структура кремнеземной матрицы может оказывать негативное влияние на физиологическое состояние иммобилизованных микроорганизмов. Для снижения механического давления матрицы на клетки повышают гибкость матрицы путем использования в золь-гель синтезе органомодифицированных силоксанов, в которых, одна или несколько алкоксильных групп замещены на алкильные. Связи Si–C не подвергаются гидролизу, поэтому алкилалкоксисиланы называют гидрофобной добавкой. При слишком большом количестве алкильных заместителей гель становится вязким и не может поддерживать структуру. При слишком малом количестве гидрофобных радикалов гель

напоминает монолит, полученный из тетраэтоксисилана [2]. Достаточно часто на практике для увеличения стабильности получаемых структур применяют модифицирование путем добавки к смеси различных полимерных веществ, в том числе водорастворимые полимеры. Полимер должен обладать когезионными свойствами, обеспечивающими образование непрерывной пленки, быть проницаемым и инертным по отношению к реакционной среде. Вещества для получения оболочек выбирают из природных и синтетических полимеров. Чаще других используют полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, нейлон, желатину, полиуретаны, стирол и полиамиды и др. [3]. Введение полимеров позволяет увеличить средний размер частиц золь и диаметр пор конечного геля.[3,4].

Нами получены матрицы в условиях золь-гель синтеза в присутствии катализатора NaF, при использовании которого образуется не монолитная, а фрактальная рыхлая структура, которая пригодна для иммобилизации целых клеток микроорганизмов [5]. В работе использовали кремнийорганические соединения тетраэтоксисилан и метилтриэтоксисилан, выполняющий роль гидрофобной добавки. В качестве структуроуправляющего агента использовали полиэтиленгликоль с различными молекулярными массами.

При иммобилизации клеток дрожжей наблюдали формирование самоорганизованной органосиликатной оболочки вокруг клеток микроорганизмов. Было выявлено, что силикатная оболочка выполняет защитную функцию клеток микроорганизмов от стрессовых факторов (УФ-облучение, ионы тяжелых металлов). При иммобилизации грамположительных и грамотрицательных бактерий наблюдали скопление микроорганизмов на поверхности частиц золь-гель матрицы. Предположительно, разница в структурах получаемых биоматериалов связана с разным химическим составом клеточных поверхностей клеток дрожжей и бактерий.

Одним из примеров практической реализации результатов работы может стать разработка на основе гибридных биоматериалов стабильных гетерогенных биокатализаторов, которые можно использовать как биораспознающие элементы биосенсора [5], как расходные материалы биофильтра для очистки метанолсодержащих стоков [6], что является актуальной задачей для экологии, биотехнологии и биоаналитической химии.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ «Мой первый грант» № 16-38-007-00.

Список литературы

1. Meunier C.F., Dandoy P., Su B.-L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials: Journal Article // J Colloid Interface Sci. 2010. Т. 342. С. 211–224.
2. Brinker C.J., Scherer G.W. Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Process: Book. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, 1990. 908 с.
3. A.C. French, A.L. Thompson B.G.D. High-purity discrete PEG-oligomer crystals allow structural insight // Angew. Chemie Int. Ed. 2009. Т. 48. С. 1248–1252.
4. M.L. Alessi, A.I. Norman, S.E. Knowlton, D.L. Ho S.C.G. Helical and coil conformations of poly(ethylene glycol) in isobutyric acid and water // Macromolecules. 2005. Т. 38. С. 9333–9340.
5. Ponamoreva O.N. и др. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors: Journal Article // Biosens. Bioelectron. 2015. Т. 67, № 0. С. 321–326.
6. Kamanina O.A. и др. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article // Enzyme Microb. Technol. 2016. Т. 92. С. 94–98.

Выделение и очистка фермента алкогольоксидазы из дрожжей *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In, определение констант Михаэлиса для выделенного фермента

Зайцева Д.Ю., Зайцев М.Г.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет (Естественно-научный институт)

Экспресс-анализ содержания спиртов в спиртосодержащих жидкостях и ферментационных средах необходим при производстве и хранении алкогольных напитков, проведении контроля параметров различных биотехнологических процессов. Традиционные методы определения либо недостаточно селективны либо отличаются высокой стоимостью используемого оборудования и сложной процедурой пробоподготовки.

При разработке экспрессных методов биоанализа наиболее перспективным является применение высокоселективных и чувствительных ферментных биосенсоров. В качестве биоматериала для иммобилизации при разработке алкобиосенсоров используют фермент алкогольоксидазу (АО), катализирующий реакцию окисления спиртов.

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

Основным источником АО являются метилотрофные дрожжи родов *Pichia* и *Hansenula*. В связи с этим, целью работы является разработка методики выделения и очистки фермента алкогольоксидазы из клеток метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* NCYC 495 In для последующего использования в биосенсорных системах.

Для выращивания дрожжей *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In использовали питательную среду для культивирования дрожжевых микроорганизмов. Клетки выращивали в шейкере - инкубаторе (180 об/мин) при 28 °С в колбах Эрленмейера с 200 мл среды. Инокулят вносили в количестве 5% по объему среды. На финальном этапе выращивания проводили процедуру индукции алкогольоксидазы микроорганизмов. Осажденную биомассу переносили в колбу с 200 мл питательной среды и добавляли метанол до концентрации 1% об. Колбу помещали в шейкер - инкубатор на 24ч (T=28⁰С, 180 об/мин). Полученную биомассу осаждали центрифугированием при 8000g в течение 15 мин. Дрожжевые клетки помещали в морозильную камеру (T= -20⁰С), чтобы увеличить время хранения.

Для выделения АО из дрожжевых клеток проводили ультразвуковое разрушение, которое является наиболее эффективным и мягким методом разрушения. Клетки ресуспендировали в 10мл калий натрий фосфатного буферного раствора pH7,6 и разрушали на УЗ диспергаторе при температуре = 2-6⁰С:6 циклов по 20 секунд с интервалом 15 секунд., клеточный дебрис осаждали на (12000 об./мин., 30 мин, 4°С). Супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Для отделения сторонних белков от АО использовали метод ступенчатого высаливания. Процедуру проводили в 3 этапа следующим способом: в супернатант вносили сухой (NH₄)₂SO₄ до концентрации 30 % от насыщения. После растворения соли экстракт выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием (8000 g, 10 мин.). Затем в супернатант вновь вносили (NH₄)₂SO₄ до 70 % от насыщения, растворяли и осадок отделяли центрифугированием. На последнем этапе вносили (NH₄)₂SO₄ до 100 % от насыщения и проводили аналогичные процедуры. На каждом этапе осаждения определяли содержание белка и удельную ферментативную

активность алкогольоксидазы. Осадки с максимальной алкогольоксидазной активностью отбирали для последующей финальной очистки от сопутствующих белков методом ионообменной хроматографии.

Для полученного фермента определяли константы Михаэлиса спектрофотометрическим методом. Константа Михаэлиса является одним из важнейших кинетических параметров любого фермента, показывающая сродство к субстратам. Для определения K_m выделенного фермента проводили серию экспериментов по определению кинетических кривых при различных концентрациях окисляемых соединений: метанола, этанола и формальдегида. Диапазон концентраций для всех субстратов составил 0,05мМ-10мМ.

За величину ответа принимали скорость увеличения оптической плотности – тангенс угла наклона линейного участка зависимости оптической плотности от времени протекания реакции. В таблице 1 представлены определенные параметры кинетических уравнений, полученных для трех окисляемых субстратов.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что выделенный в лаборатории фермент АО обладает наибольшим сродством к метанолу, что хорошо согласуется с литературными данными. Значения констант Михаэлиса могут отличаться в зависимости от фермента и условий проведения анализа, поэтому наблюдается некоторое несоответствие с абсолютными значениями, представленными в разных литературных источниках [1].

Список литературы

1. S.V. Shleev. Purification and Characterization of Alcohol Oxidase from a Genetically Constructed Over-producing Strain of the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. / S.V. Shleev G.P. Shumakovich, O.V. Nikitina, O.V. Morozova, H. M. Pavlishko, G.Z. Gayda, and M. V. Gonchar // Biochemistry. - 2006. - V. 71. – P. 245-250.

Таблица 1

Параметры кинетических уравнений окисляемых субстратов

Субстрат	Параметр уравнения	Значение	Станд. отклонение
Метанол	K_m , мМ	0,34	0,05
	V_{max} , с ⁻¹	0,051	0,002
Формальдегид	K_m , мМ	1,1	0,2
	V_{max} , с ⁻¹	0,0141	0,0007
Этанол	K_m , мМ	2,2	0,3
	V_{max} , с ⁻¹	0,026	0,001

Эффективность цианобактериальной инокуляции семян при выращивании растений гороха в почвах, загрязненных медью

Горностаева Е.А.¹, Домрачева Л.И.², Казакова Д.В.²

¹ ФГБОУ ВО Вятский государственный университет (кафедра промышленной и прикладной экологии)

² ФГБОУ ВО Вятская государственная сельскохозяйственная академия (кафедра биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии)

Количество тяжелых металлов (ТМ), поступающих в окружающую среду в результате техногенеза, очень часто превышает уровень их естественного поступления. При этом высокие концентрации ТМ наблюдаются и в агроэкосистемах из-за оседания аэрозолей и пыли. Поэтому актуальна проблема, связанная с биоремедиацией загрязненных почв, а также поиском микроорганизмов, способных выполнять защитные и сорбционные функции. Среди таких микроорганизмов большую роль могут играть почвенные цианобактерии (ЦБ). Ранее нами было показано, что ЦБ могут адаптироваться к различным поллютантам, аккумулировать и обезвреживать их, включая ТМ [1-3]. При этом отдельные штаммы ЦБ обладают полифункциональным действием по отношению к высшим растениям. Например, рекогносцировочные опыты, в которых обработка семян люцерны рогатого проводилась ЦБ *Fischerella muscicola*, показали перспективность разработки цианобактериального препарата, предназначенного для увеличения продуктивности растения, что проявлялось прежде всего в повышении интенсивности образования клубеньков и накопления сухой массы в процессе вегетации у бобового растения [4].

Целью данных опытов было изучение влияния возрастающих концентраций ионов меди и предпосевной цианобактериальной инокуляции семян на урожайность гороха и развитие почвенных грибных комплексов.

Опыт проводили в полевых условиях с внесением меди в виде соли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 3, 150 и 300 мг/кг, что соответствует 1, 50 и 100 ПДК для почвы. Предпосевную обработку семян проводили двумя видами ЦБ *Nostoc linckia* и *F. muscicola*. Анализ полученных результатов показал, что предпосевная инокуляция семян ЦБ приводит к повышению численности микромицетов в почве почти в 3 раза в случае *N. linckia* и почти в 2 раза при использовании *F. muscicola*. Эти результаты коррелируют с показателями урожайности гороха в данных вариантах (таблица). Практически во всех вариантах интродукция ЦБ в почву снижает токсичность меди для высшего растения, что проявляется в росте урожайности семян гороха от 7 до 42,8% в случае *N. linckia* и от 24 до 47% в случае *F. muscicola*.

Таблица

Влияние возрастающих концентраций меди на численность микромицетов в почве (тыс. фрагментов мицелия/г) и урожайность гороха (г/м²)

Вариант	Численность микромицетов	% к контролю	Урожайность гороха	% к контролю		
	окрашенных	бесцветных	всего			
Контроль	550±170	1430±400	1980±570	100,0	709,2	100,0

<i>N. linckia</i>	2600±300	3000±600	5600±900	282,8	729,8	102,9
<i>F. muscicola</i>	1970±230	1970±200	3940±430	199,0	716,4	101,0
Cu ²⁺ 1 ПДК	1770±200	600±100	2370±300	119,7	699,8	100
<i>N. linckia</i> +Cu ²⁺ 1 ПДК	3033±250	1630±230	4663±480	235,5	751,6	107,4
<i>F. muscicola</i> + Cu ²⁺ 1 ПДК	1130±32	570±100	1700±132	85,8	565,2	78,9
Cu ²⁺ 50 ПДК	7400±1100	1530±35	8930±1130	451,0	478,1	100,0
<i>N. linckia</i> + Cu ²⁺ 50ПДК	4170±550	1230±50	5400±600	272,7	682,9	142,8
<i>F. muscicola</i> + Cu ²⁺ 50ПДК	1130±300	570±100	1700±400	85,8	704,1	147,2
Cu ²⁺ 100ПДК	9570±800	1770±300	11340±1100	572,7	508,1	100,0
<i>N. linckia</i> + Cu ²⁺ 100ПДК	2267±370	1130±50	3397±420	171,6	706,4	139,1
<i>F. muscicola</i> + Cu ²⁺ 100ПДК	1400±100	640±200	2040±300	103,0	630,0	124,0

Примечательно, что, помимо влияния на численность микромицетов в почве, медь оказывает существенное влияние на структуру грибных популяций, увеличивая уровень их меланизации, что является одним из индикаторных неспецифических признаков загрязнения почвы. Однако цианобактериальная интродукция несколько снижает медный стресс для грибных сообществ (рис.).

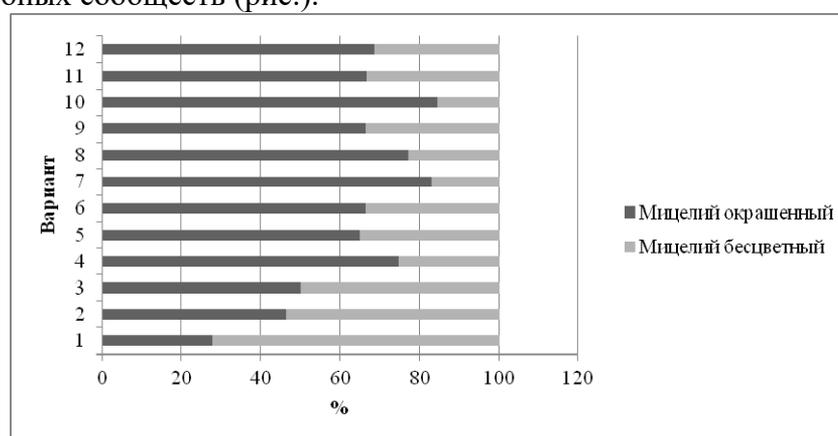


Рис. Влияние возрастающих концентраций меди на структуру грибных популяций (%). Варианты: 1. Контроль (без обработки). 2. *N. linckia*. 3. *F. muscicola*. 4. Cu²⁺ 1 ПДК. 5. *N. linckia* + Cu²⁺ 1 ПДК. 6. *F. muscicola*+ Cu²⁺ 1 ПДК. 7. Cu²⁺ 50 ПДК. 8. *N. linckia*+ Cu²⁺ 50ПДК. 9. *F. muscicola* + Cu²⁺ 50ПДК. 10. Cu²⁺ 100ПДК. 11. *N. linckia*+Cu²⁺ 100 ПДК. 12. *F. muscicola*+ Cu²⁺ 100 ПДК

Список литературы

1. Горностаева Е.А., Фокина А.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Домрачева Л.И., Лаптев Д.С., Сланикова Е.М. Потенциал природных биопленок *Nostoc commune* как сорбентов тяжелых металлов в водной среде // Вода: химия и экология. – 2013. №1. – С. 93-101.
2. Казакова Д.В., Леонова К.А., Субботина Е.С., Домрачева Л.И., Горностаева Е.А. // Экология родного края: проблемы и пути решения. Сб. материалов Всеросс. научно-практ. конф. и с международным участием. 2016. С. 170-172.
3. Домрачева Л.И., Горностаева Е.А. // Реакция альго-цианобактериальных комплексов на возрастающие концентрации ионов меди в почве под различными сельскохозяйственными культурами. Теор. и прикл. экология. 2016. №1. С. 38-43.
4. Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Ковина А.Л., Горностаева Е.А., Казакова Д.В., Субботина Е.С. Микробная интродукция и состояние почвенной аборигенной микрофлоры // Теор. и прикл. экология. 2015. №2. С. 55-59

**Анализ генетического разнообразия клинических штаммов
Acinetobacter baumannii на территории России, Беларуси
и Казахстана по данным SNP-типирования**

**Шек Е.А.^{1,2}, Эйдельштейн М.В.¹, Сухорукова М.В.¹,
Склеенова Е.Ю.¹, Трушин И.В.¹, Коннова С.А.²**

¹ ФГБОУ ВО СГМУ НИИ Антимикробной Химиотерапии

² ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Среди возбудителей внутрибольничных инфекций в России *Acinetobacter baumannii* входит в четверку лидеров наравне с *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. Успешное распространение *A. baumannii* в госпитальной среде во многом связано с быстрым накоплением детерминант резистентности к разным классам антибиотиков. Карбапенемы долгое время служили препаратами выбора для лечения тяжелых инфекций. Устойчивость к данному классу антибиотиков у *A. baumannii*, как правило, связана с продукцией карбапенемаз: ферментов, гидролизующих молекулу антибиотика. Кроме того, резистентность к карбапенемам у *A. baumannii* часто сочетается с устойчивостью к другим классам антибактериальных препаратов и существенно ограничивает выбор антимикробной терапии. Эпидемическое распространение *A. baumannii* во всем мире связано с преобладанием двух доминирующих генетических линий, которые вследствие этого получили название международных клональных линий ICL I и ICL II. Согласно схемам мультилокусного секвенирования типирования (МЛСТ) *A. baumannii* Университета Оксфорда и Института Пастера доминирующие клоны соответствуют клональным комплексам CC109^{OXF}/CC1^{PAS} (ICL I) и CC92^{OXF}/CC2^{PAS} (ICL II).

Целью настоящего исследования является изучение генетического разнообразия клинических штаммов *A. baumannii*, выделенных на территории России, Беларуси и Казахстана и изучение вклада штаммов *A. baumannii* различных генотипов в распространение резистентности к карбапенемам.

В исследование включено 1150 неповторяющихся клинических изолятов *A. baumannii*, полученных из 45 городов России, Беларуси и Казахстана и собранных в рамках многоцентровых исследований, проводимых на базе НИИАХ с 2002 г. по 2015 г. Определение чувствительности к карбапенемам (имипенему и меропенему) проводили

методом последовательных разведений с последующей интерпретацией результатов в соответствии с критериями EUCAST (<http://www.eucast.org/>). Оценку генетического разнообразия проводили методом высокопроизводительного SNP-типирования (Sheck E., 2015). Эта технология основана на определении и сравнении набора из 21 однонуклеотидного полиморфизма (SNP), расположенные в 10 генетических локусах, которые включены в обе схемы МЛСТ. Детекцию распространенных генов карбапенемаз осуществляли с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® MDR Acinetobacter-OXA-FL» (для детекции OXA-23-like, OXA-24/40-like и OXA-58-like) и «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (для детекции VIM, IMP и NDM) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Детекцию и дифференциацию карбапенемаз и β-лактамаз расширенного спектра группы GES осуществляли с помощью метода ПЦР в реальном времени с эффектом гашения флуоресцентного сигнала зонда праймером. Для хранения и обработки данных SNP-типирования *A. baumannii*, использовалась разработанная нами открытая база данных (<http://snptab.antibiotic.ru>), а также программное обеспечение Phyloviz 2.0 (<http://www.phyloviz.net/>).

Исследованные изоляты *A. baumannii* группируются в 53 SNP-типа. В популяционной структуре *A. baumannii* на территории России и Беларуси наблюдается преобладание трех доминирующих генетических линий, две из которых соответствуют международным клональным линиям CC109^{OXF}/CC1^{PAS} (7 родственных генотипов) и CC92^{OXF}/CC2^{PAS} (12 генотипов) и распространены в 35 и 40 городах России, Беларуси и Казахстана, соответственно. Третья доминирующая генетическая линия соответствует CC944^{OXF} по схеме МЛСТ Университета Оксфорда и является эндемичной на территории России и Беларуси (распространена в 24 городах). Внутри отдельных городов России и Беларуси наблюдается циркуляция изолятов *A. baumannii*, относящихся к различным генетическим линиям. Наибольшее разнообразие генотипов отмечается в Москве (27 генотипов) и Санкт-Петербурге (14 генотипов). Ситуация в Казахстане совершенно противоположна: в стационарах трех городов преимущественно распространены изоляты одного генотипа, относящегося к международной клональной линии CC92^{OXF}/CC2^{PAS}.

Изоляты *A. baumannii*, нечувствительные к карбапенемам (имипенему или меропенему), обнаружены среди 28 генотипов и составляют 81,3% (935/1150), причем из них карбапенемазо-продуцирующие изоляты составляют 89,2% (834/935). Преобладают карбапенемазы групп OXA-24/40-like (38,3%, 441/1150) и OXA-23-like (31,7%, 364/1150), тогда как карбапенемазы группы OXA-58-like представлены значительно реже (2,3%, 26/1150). Металло-β-лактамазы не выявлены. Наличие β-лактамаз расширенного спектра группы GES (GES-1-like) обнаружено у 1,7% (19/1150) изолятов, причем большинство из них (12 изолятов) относились к одному генотипу. Наличие карбапенемаз группы GES (GES-2-like и GES-5-like) не обнаружено. Пять изолятов (0,4%) содержали одновременно нескольких детерминант устойчивости OXA-23-like и OXA-24/40-like, причем два изолята дополнительно переносили β-лактамазу расширенного спектра GES-1-like.

Таким образом, популяция штаммов *A. baumannii*, циркулирующих в стационарах России, Беларуси и Казахстана характеризуется значительным разнообразием. Наблюдается параллельное распространение отдельных генетических линий в городах России и Беларуси, тогда как в Казахстане отмечается преимущественно моноклональное распространение штаммов CC92^{OXF}/CC2^{PAS}. Доля нечувствительных к карбапенемам штаммов среди доминирующих генетических линий выше, чем таковая среди всех остальных генотипов (84,4% против 50,5%, соответственно). Производители карбапенемаз встречаются чаще среди доминирующих клонов CC92^{OXF}/CC2^{PAS} и CC944^{OXF}: 80,1% и 99,5%, соответственно. Отмечается горизонтальное распространение различных генов OXA-карбапенемаз, что существенно осложняет контроль за распространением устойчивости к карбапенемам.

Данное исследование популяционной структуры *A. baumannii* является крупнейшим как на национальном, так и на международном уровне и представляет масштабные данные о циркуляции основных генетических линий в стационарах России, Беларуси и Казахстана.

Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса путем создания экспрессирующих конструкций на основе плазмиды *pJN105*

**Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Гуменко Р.С., Владимирова А.А.,
Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х.**

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа (Лаборатория молекулярной биологии и нанобиотехнологии)

Изучение генов азотфиксации у свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов позволило установить сходства и различия в их структурно-функциональной организации. Транскрипция *nif* генов активируется продуктом гена *nifA*. Интересным является тот факт, что за активацию всей системы азотфиксации как у свободноживущих, так и у симбиотических азотфиксаторов отвечает продукт всего лишь одного гена *nifA*. Это дает возможность искусственно изменять его регуляцию и, по сути, изменять азотфиксирующий статус микроорганизма.

У ризобий, в отличие от свободноживущих азотфиксаторов, регуляция экспрессии *сум*-генов осуществляется не только внешними факторами (в основном, кислородом), но и растением-хозяином. Следовательно, искусственное изменение регуляции гена *nifA*, придаст им способность фиксировать азот *ex planta*, что существенно расширит границы применения клубеньковых бактерий в качестве биоудобрений [1].

Целью данной работы было создание штаммов клубеньковых бактерий, способных к фиксации азота в свободноживущем состоянии. Нами была создана конструкция, содержащая ген *nifA*, который находится под управлением промотора *ParaBAD*. За основу была взята плазида *pJN105*. Клонированный ген *nifA* был амплифицирован с использованием специально подобранных праймеров, содержащих специальный участок-сайт посадки рибосомы (RBS), для гарантированного попадания *nifA* гена под рамку считывания. Для того, чтобы удостовериться, что промотор работает в штаммах ризобий, нами параллельно была создана подобная же конструкция, где вместо целевого гена был вставлен репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. При трансформации данной конструкцией ризобий образовывались зелено окрашенные клоны бактерий, что доказывает функциональность промотора в анализируемых бактериях. Полученные после трансформации конструкцией *pJNRBSnifA R.leguminosarum* были испытаны на их способность к фиксации азота в свободноживущем состоянии. На основании проведенных экспериментов получены первичные данные по нитрогеназной эффективности полученных рекомбинантных ризобияльных штаммов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 26 16-34-00278\16.

Список литературы

1. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего // СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та. 2009. С. 8.

Структурно-временная сукцессия биоценоза активного ила городских очистных сооружений

Конорова Ю.С.^{1,2}, Балымова Е.С.^{1,2}, Ахмадуллина Ф.Ю.²

¹ ОАО «Казанский завод синтетического каучука», г. Казань

² ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

Эффективность биологической очистки сточных вод зависит от множества факторов, в том числе и от параметров окружающей среды, таких как температура воздуха и очищаемой сточной воды. Оптимальная температура протекания процесса биоочистки считается (20-30) °С при этом наблюдается высокое биологическое разнообразие и эффективность процесса очистки сточных вод.

В связи с этим особую актуальность приобретает изучение структурно-временной сукцессии биоценоза активного ила, осуществляющего очистку сточных вод.

Материалом для данной работы послужили пробы активного ила, отобранные из аэротенков очистных сооружений г. Казань. Пробы для определения эукариот (преимущественно простейших) отбирались посезонно и подекадно, что позволило проследить сезонный аспект выбранной для наблюдения группы животных. Кроме простейших, предметом исследования явились черви (*Oligochaeta*, *Nematoda*), коловратки (*Rotatoria*), тихоходки (тип *Tardigrada*). Пробы отбирались на выходе из регенератора постоянно работающих аэротенков.

Для расчетов таксономического разнообразия, степени фаунистического сходства между обобщенными результатами по сезонам, выявления доминирования отдельных родов использовали индексы Шеннона, Серенсена, Паляя-Ковнацки, соответственно [1-3].

Оценку состояния биоценоза активного ила проводили также с использованием комбинированного показателя, учитывающего степень разрушения его флоккул и изменение родового биоразнообразия, что позволяет более достоверно оценить уровень его стресса, обусловленного воздействием различных факторов [4].

Обработка результатов микроскопирования позволила выявить достаточно большое разнообразие протозойно-коловраточного компонента микробиоты аэротенков по сезонам, смену состава представителей разных типов, классов, отрядов и родов.

По результатам гидробиологического анализа биоценоза активного ила за изучаемым период были сделаны следующие выводы:

1. Биологическое разнообразие протозойного комплекса активного ила возрастает в летний период времени, когда температура иловой смеси не ниже 20 °С, до 4,05 по индексу Шеннона и 0,016 по комбинированному показателю.

2. Многочисленного развития в летний период получили тихоходки. Практически все особи содержали от 4 до 8 яиц, что свидетельствует о благоприятных условиях не только для развития, но и для размножения данных организмов.

3. Наиболее низкие показатели биоразнообразия и высокое значение комбинированного показателя (высокой уровень стресса биоценоза) характерны для осенне-зимнего периода 0,52 и 3,08 соответственно. Начиная с ноября, изучаемые показатели активного ила резко ухудшаются, пик приходится на январь.

Проведенные систематические исследования активного ила, осуществляющего биологическую очистку сточных вод, показали значительный вклад температуры окружающего воздуха и сточной воды в аэротенке на качественные и количественные изменения состава во времени и, как следствие, в эффективность процесса биоочистки.

Дополнительные исследования позволят выявить основные закономерности сукцессии биоценоза с целью оперативного управления процессом биологической очистки для повышения его эффективности.

Список литературы:

1. Жмур Н.С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н.С. Жмур. – М.: Луч, 1997. – 172 с.
2. Дулепов В.И. Системная экология / В.И. Дулепов, О.А. Лескова, И. С. Майоров; под ред. Л.И. Александровой. – Владивосток, 2004. – 204 с.
3. Шитиков В.К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В.К. Шитиков, Г.С. Розенберг, Т.Д.Зинченко // Тольятти: ИЭВБ РАН. 2003. 463 с.
4. Балымова Е.С. Экспресс-метод контроля для управления процессом биологической очистки сточных вод нефтехимического комплекса (на примере ОАО «Казаньоргсинтез»): дис. канд. техн. наук. КНИТУ, Казань, 2015.

Биодиагностика активного ила, формирующегося на сточных водах содержащих тяжелые металлы

Балымова Е.С.^{1,2}, Ахмадуллина Ф.Ю.²

¹ ОАО «Казанский завод синтетического каучука», г. Казань

² ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

Сточные воды, поступающие на городские очистные сооружения содержат сотни загрязняющих веществ, некоторые из которых даже при незначительно содержании оказывают губительное воздействие на состояние активного ила, осуществляющего очистку. Тяжелые металлы наиболее распространенная группа токсичных, трудноокисляемых загрязнений, присутствующих в сточных водах [1].

В процессе биохимической очистки часть ионов тяжелых металлов аккумулируется илом. При этом происходит образование комплексов ионов с белком активного ила, следствием чего является, с одной стороны, накопление соединений металлов в осадках, а с другой – снижение качества очистки сточных вод, так как сорбированные металлы концентрируются в активном иле и с возвратным илом однократно попадают в аэротенк, где значительная часть подаваемого кислорода воздуха затрачивается не на эффективное биологическое окисление загрязнений, а на восстановление свойств активного ила после токсического повреждающего воздействия.

Тяжелые металлы, такие как хром и никель, вызывают денатурацию ферментов активного ила, это ингибирует их активность и нарушает проницаемость мембран у организмов ила, что приводит к его гибели [2].

В связи с этим в настоящей работе была проведена биодиагностика активного ила в процессе биологической очистки при различных условиях его функционирования по содержанию тяжелых металлов (никель, железо, хром).

Диапазон изучаемых концентраций тяжелых металлов составлял для железа (0,5-50,0) мг/дм³, хрома (0,25-25,0) мг/дм³, никеля (0,05-5,0) мг/дм³.

Экспериментальные исследования проводили на модельной установке биологической очистки сточных вод в условиях максимально приближенных к реальным (концентрация растворенного кислорода, условия смешения сточной воды и активного ила, продолжительность процесса биоочистки). В каждом модуле создавали определенные условия функционирования ила по содержанию тяжелых металлов. Один модуль –

контрольный, где осуществлялась биологическая очистка исходной сточной воды без добавления токсикантов.

В работе предполагалось микроскопирование иловой суспензии в динамике после добавления токсикантов через 1, 2,5 и 4 часа аэрации, а также исходного активного ила, иловой смеси, полученной после смешения активного ила и сточной воды без добавления тяжелых металлов.

Количественную оценку состояния активного ила осуществляли по индексу Шеннона [1], пятибалльной шкале оценок [3] и комбинированному показателю [4]. Это позволило оценить совокупное влияние различных концентраций тяжелых металлов на активный ил, диагностировать восстановительный потенциал биоценоза активного ила и классифицировать изучаемый биоценоз.

Полученные результаты микроскопирования с количественной оценкой состояния активного ила по выбранным критериям подвергали математической обработке с использованием пакета программ «Statistica 6.0».

Анализ полученных результатов позволил сделать вывод, что негативное воздействие токсикантов приводит к разрушению хлопьев активного ила, появлению большого числа свободноплавающих клеток, что наблюдалось практически при всех изученных концентрациях, в результате повышалась мутность надильовой жидкости.

При превышении концентрации тяжелых металлов выше 0,5 предельно допустимой концентрации для биологической очистки сточных вод не наблюдалось полного восстановления активного ила по окончании процесса биологической очистки.

Таким образом, при ухудшении условий функционирования искусственной экосистемы – повышение концентрации тяжелых металлов, или условий формирования – ухудшается состояние исходного активного ила и отсутствует полное восстановление биоагента по окончании процесса биологической очистки. Поэтому рекомендуется проводить дополнительное исследование содержания в сточных водах, сбрасываемых в систему городской канализации с предприятий, таких тяжелых металлов, как железо, никель и хром [5].

Список литературы

1. Жмур Н.С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н.С. Жмур. – М.: Луч, 1997. – 172 с.
2. Липеровская Е.С. Гидробиологические индикаторы состояния активного ила и их роль в биологической очистки сточных вод / Е.С.Липеровская // В кн.: Общая биология. Биоценология. Гидробиология. Т.4. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ АН СССР. 1977. С169-208.
3. Шитиков В.К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В.К. Шитиков, Г.С. Розенберг, Т.Д.Зинченко // Тольятти: ИЭВБ РАН. 2003. 463 с.
4. Балымова Е.С. Экспресс-метод контроля для управления процессом биологической очистки сточных вод нефтехимического комплекса (на примере ОАО «Казаньоргсинтез»): дис. канд. техн. наук. КНИТУ, Казань, 2015.
5. Постановление Правительства от 29.07.2013 № 644 «Об утверждении Правил водоснабжения и водоотведения и о внесении изменений в некоторые акты Правительства РФ»

Биодиагностика активного ила, формирующегося на сточных водах, содержащих тяжелые металлы

Сотников А.В.¹, Сироткин А.С.², Балымова Е.С.^{1,2}

¹ ОАО «Казанский завод синтетического каучука», г. Казань

² ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань

Предприятия химической и нефтехимической отрасли зачастую имеют множество проблем с качеством отводимых с основного производства сточных вод и промышленными выбросами, очистка которых ресурсо- и энергозатратный процесс. Обладая современными технологиями и богатым научно-производственным опытом специалистов, ОАО «Казанский завод синтетического каучука» (КЗСК) производит уникальную высококачественную продукцию, находящую применение в самых различных отраслях промышленности стран СНГ и дальнего зарубежья. Вследствие этого на предприятии формируются сточные воды оригинального состава с большим содержанием восстановленных соединений серы, проблема очистки которых является одним из приоритетных экологических и экономических аспектов предприятия.

Увеличение объемов основного производства завода привело к изменению состава и объема сточных вод при высоком значении отношения химического потребления кислорода (ХПК) к биологическому потреблению кислорода (БПК₂₀) (ХПК/БПК₂₀).

Известно, что для удовлетворительной работы биологических очистных сооружений, соотношение ХПК/БПК₂₀ должно быть не более 1,5 [1], а увеличение данного соотношения до 3,0 в 2015 г. приводит к негативным последствиям для биоценоза активного ила, участвующего в очистке сточных вод. Применительно к процессу биологической очистки сточных вод ОАО «КЗСК», это проявляется в измельчении хлопьев активного ила, характерном выносе биомассы из системы «аэротенк – вторичный с очищенной водой отстойник», и, как следствие, в снижении качества очищенных сточных вод. Снижение значения соотношения БПК₂₀/ХПК от 0,51 до 0,33 свидетельствует о наличии в сточных водах биологически сложноокисляемых соединений.

Трансформация восстановленных соединений серы в составе сточных вод на сооружениях биологической очистки предполагает комбинированные аэробно-анаэробные процессы биоокисления и восстановления, а также химического окисления и отдувки в результате перемешивания и подачи атмосферного воздуха в иловую смесь [2]. В аэротенках процесс окисления серы чаще всего завершается на одной из промежуточных стадий окисления и нередко, особенно в неудовлетворительных кислородных условиях, идет до конца с образованием элементарной серы [3].

В результате анализа путей решения рассмотренной проблемы был разработан проект внедрения в основном производстве дополнительной стадии очистки сточных вод путем их декантирования. Предварительная обработка сточных вод непосредственно в производственном цикле предусматривала отстаивание сточных вод и выделение разнообразных соединений серы с рециркуляцией их в производство.

Внедрение разработанного технического приема позволило снизить производственные издержки и обеспечило сокращение количества стоков, отводимых на биологические очистные сооружения предприятия, загрязненности сточных вод и снижение содержания восстановленных соединений серы в их составе [4].

В ходе промышленных испытаний процесса предварительного декантирования серосодержащих сточных вод и результатов биологической диагностики состояния

активного ила было отмечено снижение значений илового индекса и предотвращение выноса хлопьев активного ила из вторичных отстойников.

Иловые хлопья стали более крупными и компактными. Улучшился процесс флокуляции: хлопья стали более компактными, надилловая жидкость - светлее. Отмечены значительные изменения в самом биоценозе активного ила: наблюдается положительная сукцессия в биоценозе, а появление и развитие таких организмов как сосущие инфузории р. *Tokophrya* (рис.1.а) и беспанцирные коловратки р. *Philodina*, р. *Rotaria* (рис.1б), свидетельствует о полном окислении загрязняющих веществ и стабилизации процесса очистки сточных вод [3].

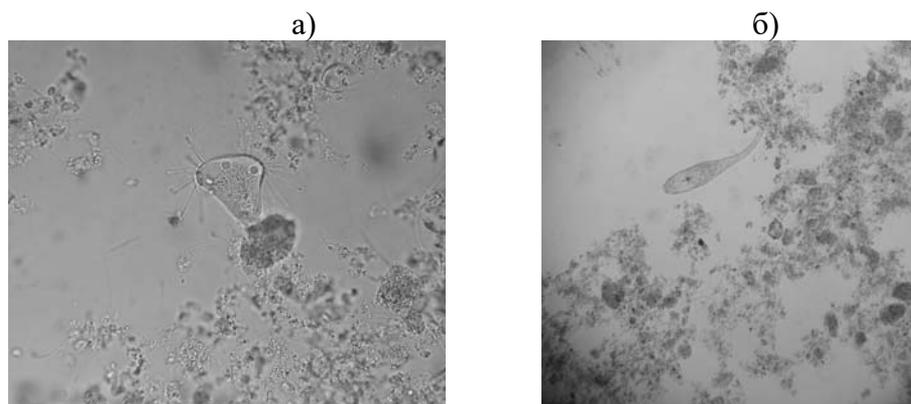


Рис.1. Биоиндикаторные организмы в биоценозе активного ила после внедрения декантирования: а – сосущих инфузорий; а – беспанцирных коловраток

Таким образом, было показано, что внедрение предлагаемой технологии предварительной обработки сточных вод – декантирования обеспечило повышение качества очищенных стоков после биологической очистки.

Список литературы

1. Методика технологического контроля работы очистных сооружений городской канализации. Изд. 3-е, перераб. и доп. М.: Стройиздат. 1977. 299 с.
2. Жизнь растений. В 6-ти т. / Ал. А. Фёдоров. М.: Просвещение, 1974. Т. 1. Введение. Бактерии и актиномицеты. Под ред. Н. А. Красильникова и А. А. Уранова. 487 с.
3. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
4. Патент №2437846 Способ утилизации сточных вод.

Продукция внеклеточной лакказы бактериями родов *Azospirillum* и *Niveispirillum*

Пономарева Е.Г., Купряшина М.А., Никитина В.Е.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
(Лаборатория микробиологии)

В последние десятилетия большое внимание уделяется поиску новых продуцентов лакказ, в том числе бактерий, и изучению оксидаз с новыми физико-химическими свойствами. Лакказы обладают широкой субстратной специфичностью и способны к

окислению многих полифенолов и ароматических аминов в реакциях восстановления молекулярного кислорода до воды. Каталитические свойства лакказ обеспечивают возможность их применения в текстильной, целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, а также в качестве агентов биоремедиации, биосенсоров и ферментов-маркеров. Лакказы выделены и хорошо изучены у высших грибов и в значительно меньшей степени у прокариот. Однако уже показано, что несмотря на более низкую каталитическую активность по сравнению с грибными лакказами, бактериальные лакказы обладают рядом особенностей не характерных для классических грибных лакказ. В частности, лакказы бактериального происхождения часто отличаются более высокой термостабильностью, способностью к окислительным реакциям без внесения дополнительных кофакторов при нейтральных или щелочных значениях pH [1]. Большинство описанных бактериальных лакказ имеют внутриклеточную локализацию.

Бактерии родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* относятся к наиболее исследуемым прокариотам, стимулирующим рост и развитие растений. Они способны к колонизации поверхности корней и стеблей, а также внутренних тканей корня без образования каких-либо специализированных структур. Ранее нами в смывах с клеточной поверхности и во внутриклеточных экстрактах ряда штаммов бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum*, выращенных на твёрдой питательной среде обнаружена лакказная активность, однако у некоторых штаммов активность фермента была крайне мала, или не детектировалась вовсе [2]. Представляло интерес обнаружение внеклеточной лакказной активности у вышеназванных бактерий при культивировании на жидкой питательной среде, что важно в биотехнологическом плане.

В задачу данного исследования входило изучение внеклеточной активности лакказы у ряда штаммов бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* и выделение чистого препарата фермента из штамма *A. brasilense* Sp245.

Первым этапом нашей работы явилось обнаружение внеклеточной активности лакказы у представителей *Azospirillum* и *Niveispirillum* при культивировании на жидкой малатно-солевой среде в течение 24 часов. В эксперимент были взяты штаммы *A. brasilense* Sp7, Sp245, Sp107, SR 80, *A. lipoferum* 59b, SR-42, *A. picis* TAR-3, *A. tiophilum* Bv-S, *N. irakense* KBC-1 и KA-3 из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. Измерение ферментативной активности проводили с использованием нескольких специфических хромогенных субстратов, так как было ожидаемо, что сродство фермента к субстрату у различных штаммов бактерий может отличаться. Все исследуемые штаммы оказались способны к продукции внеклеточной лакказы, при этом как представители азоспирилл, так и нивеиспириллы проявляли большую активность при использовании в качестве хромогенного субстрата 2,6-диметоксифенола, который, по данным некоторых авторов, является природным субстратом лакказ. Однако, для штамма *A. lipoferum* SR 42 было характерно проявление сродства фермента к синингалдазину – субстрату, специфичному для многих грибных лакказ. Интересным представляется тот факт, что штаммы *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* 59b, *N. irakense* KBC-1 и *N. irakense* KA-3, для которых отмечались крайне низкие, следовые, значения лакказной активности во внутриклеточных экстрактах и в смывах с бактериальной поверхности, проявляли высокую активность внеклеточной лакказы.

Нами было исследовано влияние присутствия ряда ароматических соединений таких как пирокатехина, фенола и гваякола в концентрациях 0.05, 0.1 и 0.5 мМ в среде культивирования на активность внеклеточной лакказы штамма *A. brasilense* Sp245. Установлено, что присутствие фенольных соединений и ионов меди стимулируют активность лакказы, однако высокие концентрации выбранных веществ подавляли рост бактерий. Максимальная активность лакказы регистрировалась при культивировании *A. brasilense* Sp245 в присутствии 0.1 мМ гваякол. Также обнаружено, что внесение CuSO_4 в

концентрации до 0.5 мМ положительно влияло на продукцию фермента, увеличивая его активность в 5-7 раз.

Для выделения чистого препарата лакказы штамм *A. brasilense* Sp245 выращивали на жидкой питательной среде в присутствии 0.1 мМ гваякола и 0.1 мМ CuSO₄. В качестве первой стадии очистки фермента использовали осаждение белков из культуральной жидкости дробным фракционированием сульфатом аммония. Далее фракции с лакказной активностью подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с Sephadex G-75 уравновешенной 0.025 М ацетатным буфером, содержащим 0.1 М NaCl, pH 4.5. Затем ферментативную вытяжку освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25. Полученные активные фракции наносили на ионообменную колонку с DEAE-Toyopearl 650M, элюцию проводили в ступенчатом градиенте соли от 0.1 до 1 М NaCl. Белки, обладающие лакказной активностью, достаточно сильно связывались с носителем и выходили в зоне концентрации соли 0.5 М. С помощью предложенной методики был получен препарат внеклеточной лакказы штамма *A. brasilense* Sp245 со степенью очистки в 17 раз. Гомогенность полученного препарата фермента подтверждали методом ДДС-Na-электрофореза. Сопоставление данных нативного и денатурирующего электрофорезов показало, что внеклеточная лакказа *A. brasilense* Sp245 – это односубъединичный фермент с молекулярной массой примерно 60 кДа. Удельная активность выделенной бактериальной лакказы составила 20.5 ед./мг. Фермент терял окислительную активность в присутствии ЭДТА, следовательно, являлся металлосодержащим. pH-оптимум лежал в кислой области (pH 3-4.5), аналогично известным грибным лакказам [3]. В тоже время лакказа *A. brasilense* Sp245 была термостабильна, и не теряла активность при инкубации при 60 °С в течении 10 мин, как и некоторые известные лакказы бактериального происхождения [4].

В результате проведенного исследования установлена способность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* к продукции внеклеточной лакказы. Впервые выделен и частично охарактеризован гомогенный препарат внеклеточной лакказы *A. brasilense* Sp245. Исследование свойств лакказы показало сочетание у фермента свойств классических грибных и бактериальных лакказ, что представляет несомненный практический интерес.

Список литературы

1. Muthukumarasamy N.P., Murugan S., Production, purification and application of bacterial laccase: a review // *Biotechnology*. 2014, 13:196-205.
2. Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г, Гоголева Ю.В. Фенолоксидазная активность бактерии рода *Azospirillum* // *Микробиология*. 2010, 3:344-351.
3. Shradha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Enzyme Res*. 2011, 1-11.
4. Sharma P., Goel R., Capalash N. Bacterial laccases // *World J Microbiol Biotechnol*. 2007, 23:823–832.

Влияние лектинов азоспирилл на некоторые метаболические характеристики растительной клетки

Аленькина С.А., Романов Н.И., Никитина В.Е.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
г. Саратов, Россия (Лаборатория микробиологии)

Ассоциативные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* – PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) микроорганизмы, стимулирующие рост растений. Считается, что

ростстимулирующий эффект бактерий связан со способностью к азотфиксации, продукции фитогормонов, сольюбилизации фосфатов, улучшением водного и минерального статуса, продукции ряда соединений, увеличивающих мембранную активность и пролиферацию тканей корневой системы, способностью уменьшать влияние стрессоров на растение и осуществлять контроль многочисленных фитопатогенов. К механизмам опосредованного растением биоконтрольного эффекта относится способность индуцировать у растений защитные реакции, направленные на повышение устойчивости [1, 2].

Образование азотфиксирующих систем включает функционирование молекул белковой природы – лектинов. С поверхности двух отличающихся по способу колонизации растений штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий - *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 были изолированы лектины, являющиеся гликопротеинами с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью [3, 4]. Было показано, что лектины азоспирилл являются полифункциональными молекулами. Помимо адгезивной функции, они способны влиять на метаболизм растительной клетки, в том числе, изменять содержание стрессовых метаболитов в растительной клетке, что свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы [5].

Как известно, в защитно-приспособительные реакции растений на действие неблагоприятных факторов внешней среды вовлечены многие физиологические и биохимические процессы. Большая их часть прямо или косвенно вовлечена в процесс формирования устойчивости [6, 7]. Важную роль в обмене веществ живого организма и защите его от повреждения играют протеолитические ферменты.

Целью данной работы была оценка возможного влияния лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 на активность протеаз и их ингибиторов в корнях проростков пшеницы.

Определение уровня влияния лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 на протеолиз в корнях проростков пшеницы проводили при нескольких значениях pH, что позволило оценить влияние лектинов на активность различных протеиназ. Было показано, что лектин *A. brasilense* Sp7 вызывал падение активности протеиназ при всех значениях pH. Наиболее значительным эффект оказался в отношении кислых и щелочных ферментов. Самыми эффективными ингибирующими концентрациями лектина при всех значениях pH явились 10 и 20 мкг/мл. Для кислых протеиназ наибольшее ингибирование наблюдалось при 15 мин инкубирования, для нейтральных протеиназ для всех временных промежутков активность ферментов не отличалась, для щелочных - наибольший ингибирующий эффект был отмечен при 15 и 30 мин воздействия лектина.

Лектин *A. brasilense* Sp245 оказывал противоположный эффект. Наблюдалось повышение активности нейтральных и щелочных протеиназ через 15 мин, достигая максимального значения после 30 мин инкубации. Для нейтральных ферментов повышение активности было более существенным. Наиболее эффективной в обоих случаях оказалась концентрация – 10 мкг/мл. Активность кислых протеиназ под влиянием лектина не изменялась.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что обработка корней проростков пшеницы лектином *A. brasilense* Sp245 приводила к значительному повышению активности протеолитических ферментов. Вероятной причиной различной функциональной активности лектинов может быть различная углеводная специфичность, структурные различия белков [3, 4], и как следствие, различное взаимодействие с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для включения последующих этапов. Различия могут быть связаны с возможным участием лектина *A. brasilense* Sp245 в проникновении бактерий во внутренние ткани корней, тем более, что

ранее была показана активная роль протеолитических ферментов азоспирилл в этом процессе [8].

Все вышесказанное позволяет сделать вывод о том, что лектины могут влиять на устойчивость растений через изменение активности протеолитических ферментов и их ингибиторов. Полученные в нашей работе результаты демонстрируют более широкий, чем считалось ранее, спектр влияния лектинов азоспирилл на метаболизм растения-хозяина и в сочетании с уже имеющимися сведениями позволят сформировать целостную картину взаимодействия бактерий с растениями на молекулярном уровне.

Список литературы

1. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 521–577.
2. Baldani J.I., Baldani V.L.D. An. Acad. Bras. Cienc. 2005. V. 77. P. 549–579.
3. Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова.- М.: Наука, 2005.С. 70–97.
4. Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Варшаломидзе О.Э., Ветчинкина Е.И., Кацы Е.И., Никитина В.Е. Микробиология. 2009. № 6. С. 749–756.
5. Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E. Plant and Soil. 2014. V. 381. P. 337–349.
6. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
7. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. Т. 64. 54 с.
8. Чернышева М.П., Аленькина С.А., Никитина В.Е., Игнатов В.В. Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 444–448.

Продуцирование экзополисахарида кефирана лактобактериями микробного консорциума кефирной закваски

Потороко И.Ю., Калинина И.В., Ботвинникова В.В.

ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ)
(Высшая медико-биологическая школа)

Учеными доказано, что потребление продуктов, полученных на основе кефирной закваски оказывает благоприятное действие на процессы метаболизма в организме человека (в том числе улучшает пищеварение, стимулирует иммунную систему и усвоение белка, обладает низким гликемическим индексом). Особый интерес представляют разработки в области исследования способов, благоприятствующих накоплению полисахаридов, продуцированных молочнокислыми микроорганизмами. Экзополисахарид (ЭПС) кефиран, продуцируемый кефирными грибами, в частности *L. kefir* и *L. Parakefir*, служит матрицей для удерживания, иммобилизации клеток микробных компонентов кефирных грибков. Эти бактерии способны удерживаться на клетках Caco-2 (аденокарциномы толстого кишечника человека), тем самым показывая хорошие пробиотические свойства данных бактерий. Основными морфологическими типами микрофлоры в исследованных образцах являлись стрептококки, диплококки, палочки, дрожжи. В технологии кефира и кефирных напитков были применены ультразвуковые воздействия, исследованные для различных пищевых сред M. Ashokkumar, D. Knorr, K.S. Suslick и др. Результаты исследования динамики ЭПС показали, что под воздействием ультразвука синтез ЭПС начинается с первых часов селекции микроорганизмов и

достигает максимума в стационарной фазе. Прирост ЭПС кефирана при ультразвуковом воздействии (180 Вт – 45 % от паспортной, 240 Вт – 60 % от паспортной) коррелирует с изменением рН и достигает в стационарной фазе 164,24...204,94 мкг/г. Таким образом, показано, что накопление кефирана в кисломолочных напитках, как фактора, определяющего, их функциональные свойства, можно регулировать за счет эффектов ультразвукового воздействия.

Биосинтез наночастиц металлов под действием экстрактов морфоструктур *Lentinus edodes*

*Лощинина Е.А., Ветчинкина Е.П., Купряшина М.А.,
Буров А.М., Никитина В.Е.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
(Лаборатория микробиологии)

Наночастицы различных химических элементов обладают уникальными каталитическими, электронными, магнитными, химическими, фотоэлектрохимическими, оптическими свойствами, что придает им важнейшее технологическое и медицинское значение. При этом физико-химические свойства, биологическая активность, степень токсичности нанообразований зависят от их размера и формы, что делает актуальной разработку новых методик получения наночастиц с требуемыми свойствами и характеристиками. В последнее время в нанотехнологии все чаще применяются простые и экологически безопасные методы биологического синтеза наночастиц с использованием живых культур бактерий, грибов, растений, водорослей, а также их биомассы, метаболитов, экстрактов, культуральных сред. Перспективным объектом для получения наночастиц являются культивируемые грибы, которые обладают мощной ферментной системой, позволяющей им переводить различные химические соединения в менее токсичные формы и аккумулировать в мицелии и среде выращивания. Однако особенности синтеза нанообразований с помощью базидиальных грибов до сих пор изучены недостаточно. Сравнительные данные о получении наночастиц с использованием грибных культур на разных стадиях морфогенетического развития в научной литературе отсутствуют.

В связи с этим, **целью настоящей работы** явилось сравнительное исследование биологического синтеза наночастиц золота и серебра с помощью экстрактов ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing на разных стадиях развития.

Культуру *L. edodes* выращивали на опилочно-зерновом субстрате. Для анализа использовали образцы белого мицелия *L. edodes* (БМ), пигментированного мицелия (ПМ), коричневой мицелиальной пленки (КМП), примордия (ПР) и плодового тела (ПТ). Водные экстракты образцов инкубировали в темноте с HAuCl_4 и AgNO_3 , анализировали с использованием методов рентгеновской флуоресценции и рентгенофазового анализа, и в результате показали, что происходит биоредукция данных соединений с образованием суспензий наночастиц золота и серебра в элементной форме.

С помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) было установлено, что форма, размер и агрегация полученных наночастиц сильно различаются при использовании экстрактов из разных морфологических структур *L. edodes*. Под действием экстракта белого мицелия синтезировались наночастицы Au^0 неправильной сферической формы размером 2–25 нм, а также небольшое количество нанотреугольников 50–75 нм и шестиугольников 15–55 нм (рис. 1). С помощью экстракта пигментированного мицелия

образовывались сферические частицы 10–35 нм и треугольники до 90 нм; экстракта мицелиальной пленки – преимущественно неправильно-сферические наночастицы 2–30 нм; экстракта примордия – частицы неправильной формы около 10 нм, часть из которых агрегировала между собой. Инкубация HAuCl_4 с экстрактом плодового тела приводила к образованию крупных частиц в форме неправильных сфер (до 170 нм) и треугольников (60-90 нм).

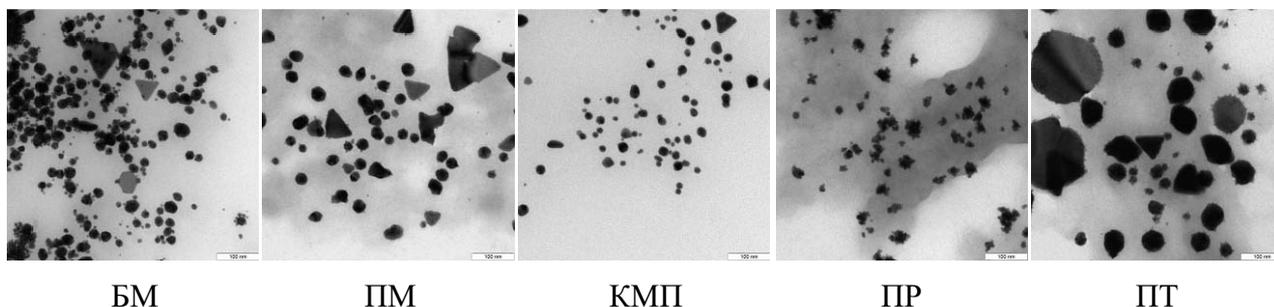


Рис. 1. ПЭМ наночастиц Au^0 , полученных с помощью экстрактов морфоструктур *L. edodes*. Масштаб – 100 нм

Наночастицы Ag^0 имели более мелкие размеры и достаточно однородную форму (рис. 2). С помощью экстракта белого мицелия образовывалась устойчивая суспензия частиц диаметром 1–10 нм, пигментированного мицелия – 5–20 нм, коричневой мицелиальной пленки – 2–15 нм. Несколько иная картина наблюдалась для экстрактов генеративных стадий *L. edodes*, где наряду с однородными мелкими наночастицами диаметром 2–5 нм образовывалось также большое количество частиц 10–15 нм, слипавшихся в конгломераты.

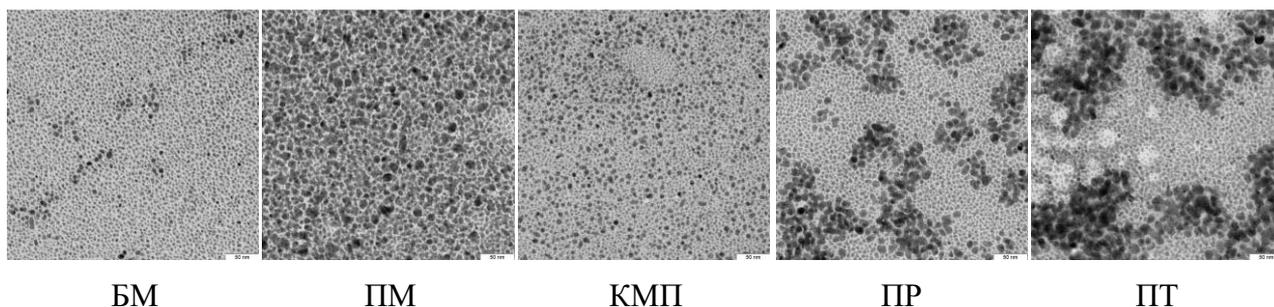


Рис. 2. ПЭМ наночастиц Ag^0 , полученных с помощью экстрактов морфоструктур *L. edodes*. Масштаб – 50 нм

Согласно ряду исследований, биологическое восстановление соединений металлов у микроорганизмов может происходить под действием их ферментов. У ксилотрофных базидиомицетов очень мощную систему представляют собой ферменты фенолоксидазного комплекса, поэтому мы предположили, что процесс образования наночастиц металлов у *L. edodes* может происходить под влиянием фенолоксидаз. Мы установили, что состав фенолоксидазного комплекса (внутриклеточных Mn-пероксидаз, лакказ и тирозиназ) и активность данных ферментов у базидиомицета *L. edodes* различались для разных морфоструктур (рис.3). Способность к восстановлению HAuCl_4 и AgNO_3 до Au^0 и Ag^0 была прямо пропорциональна активности ферментов – у экстрактов с более высокой активностью восстановление и биосинтез наночастиц проходили быстрее. Максимальная активность всех фенолоксидаз наблюдалась у мицелиальной пленки, и под действием экстрактов данной морфоструктуры происходил интенсивный синтез большого количества наночастиц малого размера и однородной формы с образованием устойчивых коллоидных растворов Au^0 и Ag^0 .

Таким образом, при использовании экстрактов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для биосинтеза наночастиц Au⁰ и Ag⁰, размер, форма и степень агрегации нанообразований различаются в зависимости от экстракта и активности фенолоксидаз.

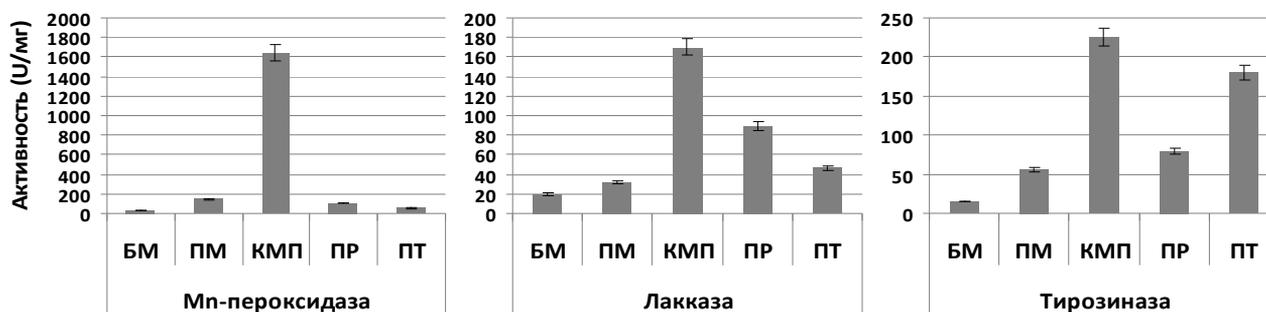


Рис. 3. Активность фенолоксидаз *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-01200 мол_а.

Влияние замещенных 2Н-хромен-2-онов на плодоношение высших грибов

Цивилева О.М.¹, Кофтин О.В.¹, Ибрагимова Д.Н.², Федотова О.В.²

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Лаборатория микробиологии)

² ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского (Институт химии)

Получено много доказательств широкого спектра биологического действия хромен-2-онов (кумаринов) природного и синтетического происхождения как основы малотоксичных и высокоэффективных лекарственных препаратов [1]. Кумарины распространены в растительном мире. Естественно предположить, что многие хромен-2-оны способны вовлекаться в биологические процессы, будучи структурно схожими с веществами фитопроисхождения. Однако практически отсутствуют работы, связанные с выявлением и исследованием действия соединений этого класса в отношении высших грибов - биологических объектов, доступных в лабораторных условиях, нетоксичных, характеризующихся устойчиво детектируемым ответом на разнообразные ксенобиотические воздействия окружающей среды. Ксилотрофные базидиомицеты - представители рода *Ganoderma* являются одними из наиболее биотехнологически ценных высших грибов съедобных и/или лекарственных видов [2].

Целью нашей работы явилась характеристика эффектов некоторых 4-гидроксикумаринов на формирование плодовых тел макробазидиомицетов рода *Ganoderma* в искусственной культуре.

Реакционная способность замещенных 2Н-хромен-2-онов и успехи их практического использования в значительной степени зависят от функциональных групп, формирующих скелет молекулы. Свойства 3-замещенных (4-гидрокси)-2Н-хромен-2-онов не были описаны в периодической печати еще 5 лет назад [1], но к настоящему времени уже выявлен значительный потенциал их биологической активности. Представляется, что он связан с

наличием карбонильных групп различного характера (кетонной и лактонной), гетероциклической системы, способной к рециклизации [3], некоторыми другими факторами.

Мы исследовали влияние оксопропил-4-гидроксихроменонов на глубинные культуры макробазидиомицетов *Ganoderma applantum*, *G. cattienensis*, *G. colossus*, *G. lucidum*, *G. neojaponicum*, *G. valesiacum*. Синтезированные на кафедре органической и биоорганической химии СГУ 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-он, соединение (I), и 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-он (II) использовали в качестве компонентов питательных сред грибов.

В отсутствие добавок соединений (I), (II), как и в присутствии соединения (I), плодоношения при использованных внешних условиях не наблюдали (рисунок 1).

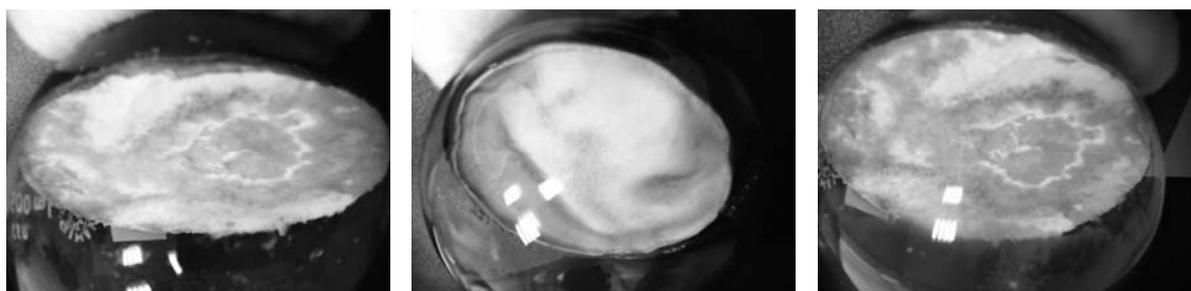


Рис. 1. Отсутствие плодоношения *Ganoderma* без добавок соединений (I), (II) и в присутствии соединения (I)

Позитивным действием, наиболее выраженным в отношении индукции плодоношения *G. cattienensis*, *G. colossus* и *G. neojaponicum*, обладало соединение (II) (рисунок 2).

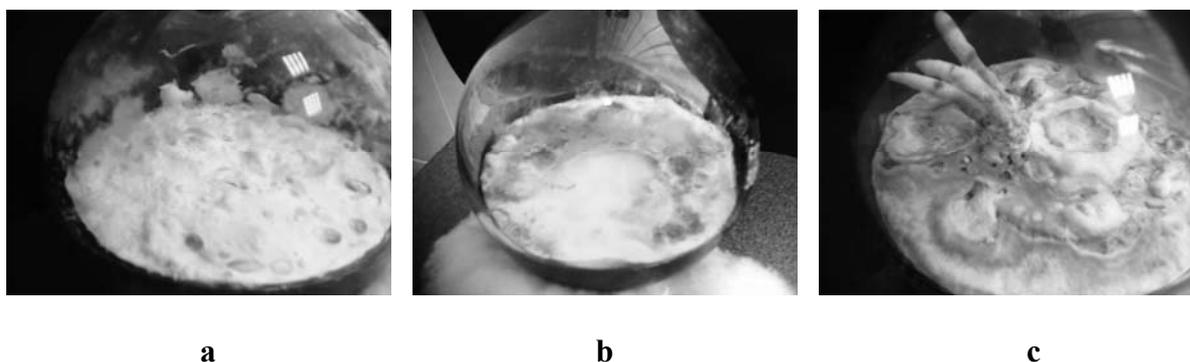


Рис. 2. Плодоношение *Ganoderma* в присутствии соединения (II):
a - *G. cattienensis*; b - *G. colossus*; c - *G. neojaponicum*

На уровне химической структуры молекул в рассматриваемой группе соединений (I), (II) наличие электроноакцепторных заместителей в кольце ароматического заместителя, таких как нитрогруппа (соединение (II)), оказывает значительное влияние на проявление рассматриваемого вида биологической активности.

Известно, что эффект действия препаратов из класса антиоксидантов может быть связан не только с их антиоксидантными свойствами, но также с их воздействием на различные сигнальные системы. Полиоксо соединения лактонной природы 2Н-хромен-2-онового ряда способны участвовать как в процессе антиоксидантной защиты, так и в индукции апоптоза, и, аналогично другим биологически активным соединениям,

осуществлять указанные эффекты путем прямого взаимодействия с белками или при ингибировании их экспрессии. По-видимому, рассматриваемые производные кумарина оказывают воздействие на сигнальные системы грибных клеток, в том числе на молекулярные мишени путей апоптоза. При неблагоприятных условиях роста культур базидиомицетов возникают биохимические условия возникновения стадий морфогенеза, предшествующих плодоношению. Может происходить взаимодействие соединений-добавок с важнейшими биологически активными соединениями (как антиоксидантной природы, так и вызывающими окислительный стресс; с соединениями другой природы, принимающими участие в цитодифференцировке у высших грибов), и развивается плодоношение.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект № 16-08-01170-а).

Список литературы

1. Мажукина О.А. Электрофильные и нуклеофильные реакции сложнопостроенных полиоксосоединений 2н-хромен-2-онового ряда // Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Саратов: СГУ, 2011. 23 с.
2. De S. Pereira-Jr J.A., Rodrigues D.P., Peixoto-Filho R.C., Bastos I.V.G.A., De Oliveira G.G., Araújo J.M., Melo S.J. Contribution to Pharmacognostic and Morphoanatomical Studies, Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Ganoderma parvulum* Murrill (Basidiomycota, Polyporales, Ganodermataceae) // Latin American Journal of Pharmacy. 2013. V. 32. № 7. P. 996-1003.
3. Кумаргалиева (Ибрагимова) Д.Н., Федотова О.В., Мажукина О.А. Реакция Манниха в ряду замещенных 4-гидрокси-2н-(пирон)хромен-2-онов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. № 4. С. 19-23.

Микробный биосенсор для оценки нового реагента очистки воды феррата калия

Зарубина А.П.¹, Перфильев Ю.Д.², Сорокина Е.В.¹

¹ Кафедра микробиологии биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносов
(лаборатория физиологии и биохимии микробов)

² Кафедра радиохимии химического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова

Очистка воды, как питьевой, так и промышленно-технической, является научной и практической проблемой. Перспективным методом очистки воды является применение ферратов (VI), щелочных металлов многофункционального действия. Ферраты (VI), обладая окисляющим и дезинфицирующим действием, разлагают многие токсичные химические вещества до малотоксичных продуктов и вызывают гибель микроорганизмов. Продуктом разложения ферратов в растворе является малотоксичный гидроксид железа, который выделяется в виде коллоидных агрегатов с очень развитой поверхностью, адсорбирующих ионы тяжелых металлов и частицы органических остатков. Эффективность ферратов для очистки воды показана на примере таких промышленных отходов, как сероводород, аммиак, цианиды и тиоцианаты, тиоацетамид и тиомочевина, и др. В настоящее время активно проводят исследования физико-химических свойств ферратов (VI) и синтезируют новые препараты, в частности, феррат калия. В работе на примере образцов воды городской и сельской среды с использованием экспресс-метода на основе бактериальной люминесценции исследованы некоторые свойства реагента химической очистки воды феррата калия - K_2FeO_4 (эффективные концентрации, предположительный механизм взаимодействия с природными загрязнителями воды, бактерицидные свойства реагента) [1].

Биотестирование осуществляли с использованием генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с созданным светящимся фенотипом, обеспеченным встроенным lux-опероном морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* 54D10, известным как биосенсор тест-системы «Эколюм-06» [2]. Индекс токсичности (Т) во времени взаимодействия биосенсора с исследуемым образцом воды определялся автоматически по программе люминометра «Биотокс» по формуле: $T=100 \cdot (I_k - I) / I_k$, где I_k и I – интенсивность свечения контроля и опыта, соответственно. Бактерицидные свойства феррата калия, содержащегося в образцах воды оценивали по выживаемости светящихся клеток бактерий (по числу КОЕ - колониеобразующих единиц), выросших на агаризованной среде LB (Лурия-Бертани) со 100 мкг/мл ампициллина в течение 24 ч при 32⁰С [2-5].

Феррат калия, известный как сильный окислитель, через 14 суток хранения в природных образцах воды утратил дезинфицирующие свойства. В образцах воды предварительно обработанных реагентом, через 30 мин взаимодействия с клетками светящихся грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12 TG1 наблюдали сохранение их жизнеспособности (по числу КОЕ). Феррат калия в концентрациях 21.0 мкг/мл и 45 мкг/мл очистил воду образцов воды, которые содержали тяжелые металлы, соответственно, образцы стали нетоксичными (рис.). Одним из механизмов действия феррата калия, как реагента очистки воды, является адсорбция тяжелых металлов продуктом разложения ферратов - гидроксидом железа [6]. Однако нетоксичные образцы воды, обработанные ферратом калия в концентрациях 32.0 мкг/мл и 51.0 мкг/мл, соответственно, стали токсичными (величины $T \approx 40$). Показатели токсичности этих образцов воды во времени анализа (5, 15 и 30 мин) практически не менялись (рис.), что может косвенно свидетельствовать о наличии в них веществ органической природы [7].

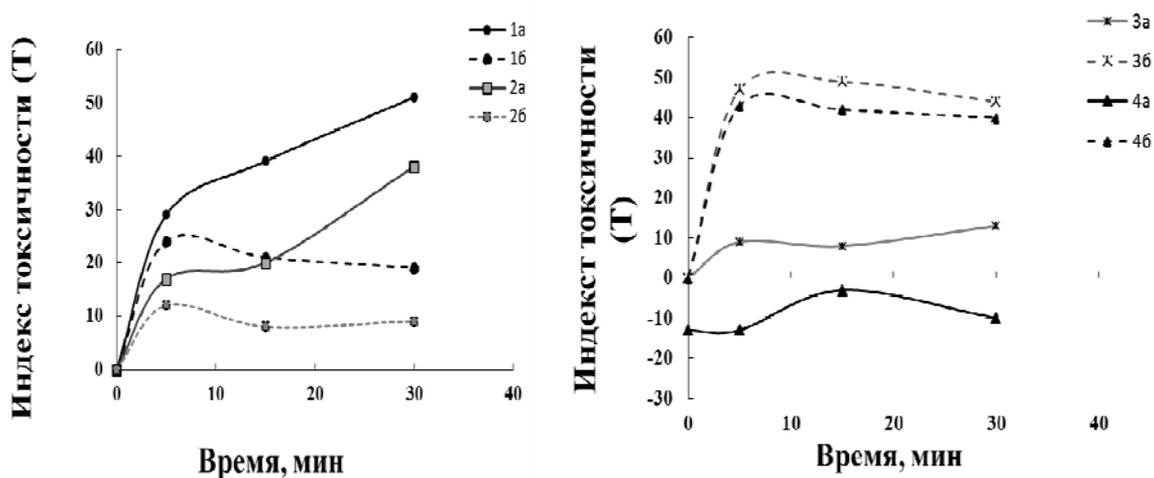


Рис. Оценка токсичности природных образцов воды (1а – 4а) и аналогичных образцов воды (1б – 4б), обработанных ферратом калия, с использованием тест – системы на основе бактериальной люминесценции. Образцы воды: 1- из реки Десны; 2 – из ручья на суглинистой почве г. Москвы; 3 - из ручья в чернозёмном сельском районе около г. Истра, 4 — смесь снега и воды, взятый в районе МГУ имени М.В. Ломоносова

Таким образом, биотестирование в течение 30 мин. с использованием тест – системы на основе бактериальной люминесценции позволило выявить качество исследуемой природной воды (токсичность, химический состав предполагаемых веществ) и изучить некоторые свойства феррата калия (активные концентрации, время хранения, возможный механизм его действия, как реагента очистки воды, в зависимости от веществ,

содержащихся в воде). Данные могут ориентировать исследователей на изучение особенностей комплексо-образования феррата калия с органическими веществами.

Экспресс метод биотестирования с использованием тест-систем на основе бактериальной люминесценции эффективен для отбора и оценки различных реагентов очистки воды, подбору их эффективных концентраций, стабильности свойств и времени обработки реагентом водных источников.

Список литературы

1. Perfiliev Yu.D. Mossbauer spectroscopy of iron in high oxidation states // Russ J Inorg. Chem. 2002. N.47. P. 611.
2. Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K. Bioluminescent Bioassays Based on Luminous Bacteria // Siberian Federal University. Series Biology. 2009. Vol. 2. N 4. P. 418–452.
3. Zarubina A.P., Gapochka M.G., Novoselova L.A., Gapochka L.D. Effect of Low Intensity Electromagnetic Radiation on the Toxicity of Domestic Wastewater Tested with the «Ecolum» Test System // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2013. Vol. 68. N 1. P. 49-52
4. Kaiser K. L. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // Environ. Health Perspect. 1998. Vol. 106. N 2. P. 583–591.
5. Zarubina A.P., Deev L.I., Parkhomenko I.M., Parshina E.Yu. Saryicheva, A.S, Novoselova L.A., Lukashev E.P., Netrusov A.I., Rubin A.B. Evaluation of toxicity of argentum ions and nanoparticles on the model bacterial object with luminescent phenotype // Nanotechnologies in Russia. 2015. Vol.10. N 5-6. P. 475-483.
6. Jiang J.-Q., Lloyd B. Progress in the development and use of ferrate(VI) salt as an oxidant and coagulant for water and wastewater treatment // Water Res. 2002. Vol. 36. N 6. P. 1397–1408.
7. Данилов В.С, Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьёва Л.Н., Карташёв Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сен- сорные биолуминесцентные системы на основе lux- оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестн. Моск ун-та. Сер. 16. Биология. 2002. № 3. С. 20–24.

Получение и исследование состава клеточной стенки *Arthrobacter nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T

Дин Фань, Юдина Т.Г., Потехина Н.В.

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва

В настоящее время род *Arthrobacter* насчитывает 86 видов (<http://www.bacterio.net/>). Виды различаются по ряду хемотаксономических признаков (состав пептидогликана, менахинонов, жирных кислот, наличие тейхоевых кислот или нейтральных полисахаридов) и образуют несколько кластеров на филогенетическом дереве, что убедительно свидетельствует о гетерогенности рода. В отличие от других признаков тейхоевые кислоты клеточных стенок, которые могут служить химическими маркерами, дифференцирующими организмы на уровне вида, изучены у незначительного числа представителя рода, тогда как структура других гликополимеров ни у одного типового штамм не определена (Потехина и др., 2012; Fiedler and Schaffler, 1987; Naumova, 1988; Takeuchi and Yokota, 1989).

Настоящее исследование было предпринято с целью определения состава сахаров и гликополимеров (в том числе наличия/отсутствия тейхоевых кислот), клеточной стенки *Arthrobacter nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T, штамма, не исследованного в этом отношении.

Культуру *A. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T выращивали на пептонно-дрожжевой среде

Список литературы

1. Потехина Н.В., Шашков А.С., Сенченкова С.Н., Дорофеева Л.И., Евтушенко Л.И. 2012. Структура гексасахарид-1-фосфатного полимера *Arthrobacter uratoxydans* ВКМ Ас-1979^T. Биохимия, **77**, 1546-1555
2. Fiedler F., and Schäffler M.J. 1987. Teichoic acids in cell wall of strains of «*nicotianaе*» group of *Arthrobacter* a chemotaxonomic marker. System. Appl. Microbiol., **9**, 16-21.
3. Naumova I.B. 1988. The teichoic acids of actinomycetes. Microbiol. Sci., **5**, 275-279.
4. Takeuchi M. and Yokota A. 1989. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol., **35**, 233–252.
5. Keddie R.M. and Bousfield I.J. 1980. Cell wall composition in the classification and identification of Coryneform bacteria. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. **8**. 167-88.

Ростстимулирующее действие цианобактерий на декоративные культуры

Трефилова Л.В., Зыкова Ю.Н., Короткова А.В.

Вятская государственная сельскохозяйственная академия (Агрономический факультет)

Преимуществом почвенных ЦБ, по сравнению с другими почвенными фототрофами, является богатый белковыми соединениями состав, широкий набор аминокислот, достаточно большое количество витаминов, веществ, стимулирующих рост и другие биологически активные соединения. Известно, что в прижизненных выделениях почвенных водорослей и ЦБ были обнаружены многие вещества высокой биологической активности. Эти вещества оказывали определенное действие на рост высших растений, приводя к ускорению роста корней, репродуктивных органов и к повышению урожая. Вместе с тем следует отметить, что в процессе образования выше указанных внеклеточных метаболитов почвенных ЦБ, принимают участие и гетеротрофные микроорганизмы, которые находятся в тесной морфологической и биологической связи с водорослями и ЦБ (бактерии-спутники). В настоящее время цианобактерии (ЦБ) применяются в различных областях сельского хозяйства.

Ранее нами было изучено ростстимулирующее действие ЦБ на таких сельскохозяйственных культурах, как яровая пшеница, озимая рожь, горох посевной, козлятник восточный, овощные (редис, рапс, капуста) [1]. Также были проведены исследования по увеличению всхожести семян пшеницы, обработанных культурой ЦБ *Nostoc paludosum*, в загрязненных почвах. Результаты показали, что их всхожесть существенно увеличивается, по сравнению с вариантом без цианобактериальной обработки, с одновременным увеличением скорости роста пшеницы.

В работах кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА впервые в истории лесоводства использовали почвенные ЦБ для обработки семян, сеянцев и саженцев хвойных культур. В результате проведенных исследований было установлено, что у обработанных ЦБ семян ели всхожесть увеличивалась до 18%, в частности ЦБ *Nostoc linckia* вызывала ризогенный эффект при котором прирост корней увеличился на 68%.

Ростстимулирующий эффект ЦБ был подтвержден на бобовых культурах, при бинарной инокуляции их семян клубеньковыми бактериями *Rhizobium loti* и ЦБ *Fischerella muscicola*, что выражалось в существенном увеличении образования клубеньков на корнях и повышении выхода ксеромассы.

Такое большое разнообразие работ по изучению ростстимулирующей способности ЦБ на различных сельскохозяйственных культурах и недостаток работ по изучению данного свойства ЦБ на декоративных культурах, определило цель нашей работы.

Цель работы: изучить влияние различных культур ЦБ на всхожесть семян, рост и развитие растений циннии.

Для исследования мы выбрали наиболее часто применяющийся для озеленения городских цветников сорт циннии изящной «Калифорнийская гигантская». Цинния изящная (*Zinnia elegans* Jacq.) семейство Астровые (сложноцветные) – однолетнее сильнорослое мощное растение раскидистой или компактной формы, с прямостоящим крепким стеблем, покрытым жестким опушением, высотой от 30 до 100 см, с немногочисленными прочными боковыми ветвями. Листья яйцевидно-заостренной формы, сидячие, супротивные. Соцветие – корзинка диаметром от 5 до 15 см в зависимости от сорта.

Соцветия имеют различную форму, могут быть простыми, полумахровыми и махровыми. Язычковые цветки различной формы и окраски расположены в 1-3 ряда у немахровых сортов и более рядов у махровых. Окраска цветков белая, желтая, розовая, оранжевая, красная и сиреневая. В цветовой гамме цинний отсутствуют только синий и голубой цвета. Трубочатые цветки желтые, реже окрашены как язычковые, образуют пышную выпуклую серединку. За цинниями очень легко ухаживать, чем и объясняется их популярность. Период цветения цинний – с раннего лета до осени.

В качестве цианобактериального инокулята из музея кафедры были отобраны следующие виды ЦБ: *N. paludosum* шт. 18, *N. linckia* шт. 271 и *Fischerella muscicola* шт. 300. Выбор этих культур обусловлен их высокой экологичностью, большой скоростью роста и ростактивирующей способностью, которую они проявляли на других декоративных культурах, таких, как разные сорта астр и подсолнечника сорта «Медвежонок».

Обработку семян растений проводили 1,5 месячными культурами ЦБ: *N. paludosum*, *N. linckia* и *Fischerella muscicola*, с титром $8,0 \cdot 10^9$; $10,7 \cdot 10^9$; $6,4 \cdot 10^9$ соответственно. По истечении 3-х суток проводили оценку всхожести семян (рис.). Посев семян циннии, заранее обработанных ЦБ, проводился в середине мая.

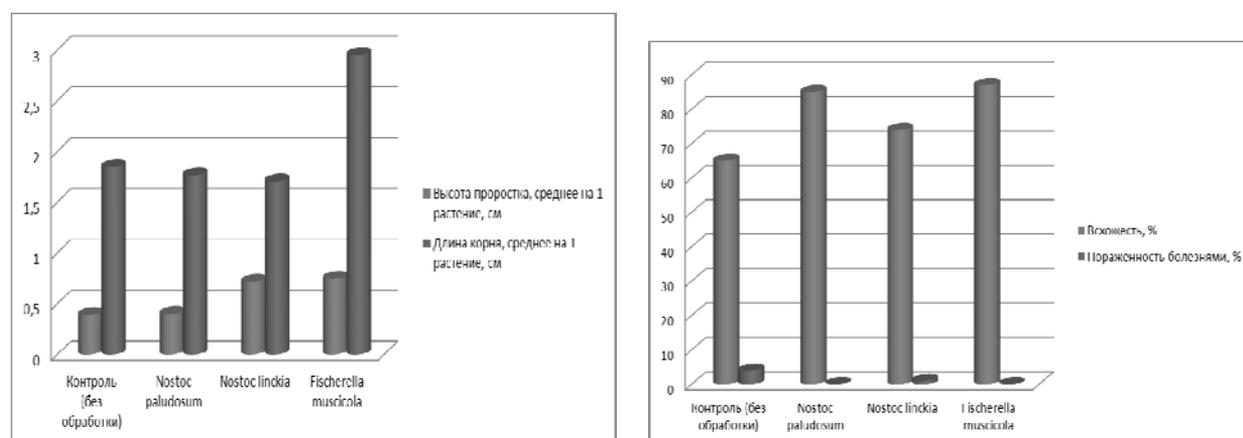


Рис. Органометрические показатели циннии изящной после обработки культурами цианобактерий

ЦБ увеличивают высоту проростков и всхожесть во всех вариантах, а также после обработки культурами *N. paludosum* и *F. muscicola* не было обнаружено пораженных болезнями проростков в этих вариантах. Показатель увеличения или наличия пораженных

болезнями проростков коррелирует со снижением всхожести семян в варианте с обработкой культурой *N. linckia*.

После определения всхожести, рассаду высаживали в грунт на хорошо освещенное место, так как циннии относятся к тепло- и светолюбивым растениям. Фаза цветения наступила в конце июля. Буйное цветение во всех вариантах продолжалось до октября.

Таким образом установили, что предпосевная обработка семян циннии цианобактериальным инокулюмом увеличивала их всхожесть до 87 %, при этом проявляется ростактивирующий и ризогенный эффект, а так же ЦБ инокуляция семян полностью ингибирует развитие фитопатогенов, что приводит к их отсутствию в опытных вариантах.

Исходя из результатов наших опытов ЦБ можно рекомендовать для предпосевной обработки семян циннии изящной.

Список литературы

1. Зыкова Ю.Н., Трефилова Л.В., Ковина А.Л. Ростстимулирующая активность цианобактерий и их роль в формировании фототрофных микробных комплексов. Материалы междунар. практ. конф. «перспективы развития науки и образования». Тамбов. 2015. С. 56-58.

Почвенные цианобактерии альгологической коллекции ACSSI: морфология, филогения и экология

Темралеева А.Д.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН
(Лаборатория физико-химии почв)

Целью альгологической коллекции ИФХиБПП РАН ACSSI (Algal Collection of Soil Science Institute) является сохранение и поддержание новых для науки или флоры, редких и сложных с таксономической точки зрения штаммов цианобактерий и микроводорослей, выделенных преимущественно из наземных экосистем России. На сегодняшний день в фонде Коллекции имеется 60 штаммов цианобактерий, изолированных из серой лесной, каштановой, луговой, бурой полупустынной почв, солонцов и таллома лишайника *Lobaria pulmonaria*. В 2016 году мы провели ревизию 45 коллекционных штаммов цианобактерий, ранее определенных нами по данным световой микроскопии, используя анализ генов *16S* рРНК и *nifH*. Совместив наблюдения за морфологией и филогенетические реконструкции, было обнаружено:

1. Доминирующим порядком цианобактерий в Коллекции является порядок Nostocales (38 штаммов), далее идет Synechococcales (5) и Oscillatoriales (2).

2. Среди Nostocales наиболее представлены цианобактерии родов *Nostoc* (23 штамма), *Cylindrospermum* (8) и *Desmonostoc* (2). Роды *Anabaena*, *Hassallia*, *Nodularia*, *Tolypothrix* и *Trichormus* насчитывают по одному представителю.

3. Только часть штаммов с *Nostoc*-подобной морфологией вошла в кладу *Nostoc sensu stricto*, а, следовательно, относится к истинным ностокам. Остальные должны быть переописаны и переопределены. Морфовид *Nostoc punctiforme*, характеризующийся очень тесно лежащими трихомами, сложно различимыми в общей массе, является гетерогенным, объединяя несколько различных генотипов, и нуждается в дальнейшей ревизии.

4. Среди Synechococcales выделяются цианобактерии родов *Nodosilinea* (3 штамма), *Leptolyngbya* (1) и *Phormidesmis* (1). В том числе штамм *Nodosilinea epilithica* ACSSI 34,

обнаруженный в каштановой почве зоны сухих степей (Волгоградская область), впервые приводится для территории России.

5. Порядок Oscillatoriales насчитывает только 2 штамма цианобактерий, первый из них принадлежит роду *Microcoleus*, а второй является кандидатом в новый род.

6. Представители рода *Nostoc* встречались повсеместно во всех типах изученных почв, цианобактерии рода *Cylindrospermum* – только в серой лесной почве (зона смешанных и широколиственных лесов), *Nodosilinea* – исключительно в почвах зоны сухих степей, *Hassallia*, *Microcoleus* и *Tolypothrix* – лишь в зоне полупустынь.

7. Валидная идентификация цианобактериальных штаммов затруднительна по целому ряду причин:

- недостаток надежных диакритических признаков и чрезвычайная морфологическая изменчивость некоторых таксонов;

- отсутствие «образцов сравнения»: аутентичных штаммов цианобактерий в коллекциях культур и референсных нуклеотидных последовательностей в GenBank;

- сложности разграничения таксонов на основе генетических дистанций.

В настоящее время ACSSI зарегистрирована во Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC) под номером 1132 и имеет свой сайт (<http://acssi.org/>). Дальнейшая ревизия фонда Коллекции планируется в следующем году.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60020 мол_а_дк.

Моделирование роста грибного мицелия с помощью клеточного автомата

Шумилов А.С., Благодатский С.А.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения
ФГБУН ИФХБПП (лаборатория моделирования экосистем)

Грибы - важный компонент почвенной микробиоты. На 1 грамм почвы может приходиться до **16 километров** гиф. Они участвуют во многих биохимических процессах азотного цикла в почве. Физиологических моделей роста гриба на клеточном автомате в мире пока не создано.

Основным действующим объектом клеточного автомата является клетка, в которой находится условная клетка мицелия – УКМ. УКМ и клетка гриба в природе не одно и то же. УКМ нужна как элементарная единица моделирования. Одна УКМ может моделировать много клеток реального мицелия.

Грибной мицелий растет в направлении большего количества ресурсов. Если их мало, то грибная гифа пытается выйти на богатый участок, путем однонаправленного роста. Ресурсы расходуются на поддержание жизни и рост новых клеток УКМ из старых. Смерть УКМ может наступить в результате голодания. После смерти ресурсы, которые содержались в мицелии, переходят в среду, если они не были использованы для энергетических целей и дыхания. Гифы не пересекаются друг с другом благодаря алгоритму негативного автотропизма.

УКМ может расти линейно или ветвиться в зависимости от доступности ресурсов [1,2]. Для роста выбирается незанятая клетка с самым большим ресурсом. Когда УКМ оказывается в бедной среде, он пытается найти среду богатую ресурсами. Эта задача

достигается быстрее в результате апикального роста. Ветвление как стратегия выбирается при большем количестве ресурсов. Логика данного процесса отражена на рисунке:

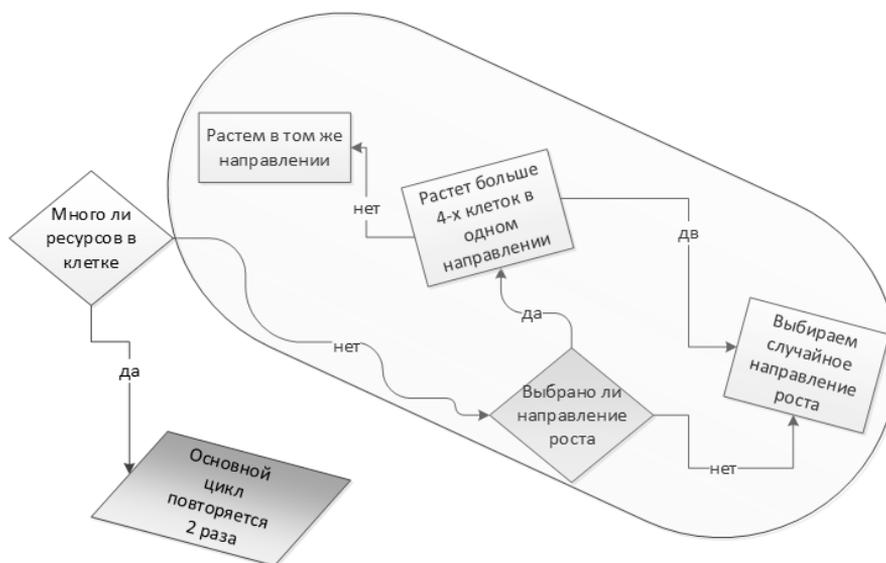


Рис.1. Логика апикального роста и ветвления

УКМ растет из материнской клетки, при этом потребляя доступные ресурсы из среды. Если УКМ больше двух шагов модели растет в бедной среде, ресурсы могут поступать из материнской клетки.

УКМ всасывает ресурсы активно и пассивно. Апикальная часть всасывает ресурсы на пять порядков быстрее. Это происходит из-за инкапсуляции зрелых гифов.

УКМ может потреблять больше ресурсов, чем ему надо на данный момент. Эти ресурсы могут трансформироваться переходя из внешнего ресурса во внутренний либо транспортируются в нуждающуюся в этом дочернюю клетку.

Формула для ресурса, транспортируемого в материнскую клетку УКМ:

$$m = \frac{sb_{ni}V_{max}/(K_m+s)}{b_i+b_{ni}}$$

Где b_i – количество центральных клеток, b_{ni} – количество апикальных клеток, s – концентрация субстрата в данной среде, V_m скорость работы фермента, а K_m - константа Михаэлиса [3,4].

Полученная модель отражает закономерности апикального роста и ветвления, потребления ресурсов мицелием и транспорта биогенных элементов по мицелию. Кроме того, она может объяснить поведение гриба в гетерогенной по ресурсам среде [4], а так же формирование ведьминых колец в природе. Для дальнейшего улучшения модели будет проведена ее параметризация и верификация, а в дальнейшем добавление нескольких видов ресурсов.

Список литературы

1. Szabo R., Štofániková V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica* //FEMS microbiology letters. – 2002. – Т. 206. – №. 1. – С. 45-50.
2. Johnsy G., Kaviyarasan V. Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative growth of *Neolentinus kauffmanii* an edible mushroom from Kanyakumari District //Int J Pharma Bio Sciences. – 2013. – Т. 4. – №. 1. – С. 469-478.

3. Falconer R. E. et al. Biomass recycling and the origin of phenotype in fungal mycelia //Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2005. – Т. 272. – №. 1573. – С. 1727-1734.
4. Ritz K. Growth responses of some soil fungi to spatially heterogeneous nutrients //FEMS Microbiology Ecology. – 1995. – Т. 16. – №. 4. – С. 269-279.

Протекторные свойства гуминовых кислот и их влияние на рост микроорганизмов

Горовцов А.В.^{1,2}, Андриянов А.И.¹, Празднова Е.В.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского. Ростов-на-Дону

² Донской зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства, п. Рассвет, Ростовская обл.

Гуминовые кислоты (ГК) являются важнейшим компонентом органического вещества почвы. Они все чаще применяются в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных культур, однако сравнительно немного известно о механизмах влияния соединений данного класса на растения и почвенные микроорганизмы. Имеются данные о том, что гуминовые кислоты влияют на жизнедеятельность даже тех видов бактерий, которые не способны их использовать. Такое прямое действие гуминовых веществ на микроорганизмы остается во многом неизученным. Чаще всего механизмы действия ГК на микроорганизмы связывают с процессами их взаимодействия с цитоплазматической мембраной клеток. В частности, под воздействием ГК показано увеличение проницаемости мембраны для ряда питательных веществ [1]. Другие авторы установили наличие у ГВ поверхностно-активных свойств, их участие в кометаболизме [2], антиоксидантную активность [3]. С воздействием на мембраны также связывают влияние ГК на бактерии и другие авторы, на основании наблюдаемого сходного стимулирующего действия Твина-80 [4]. Описан также ряд протекторных эффектов ГК для бактерий. Показано, что внесение ГК в среду культивирования повышает устойчивость бактерий *Rhodococcus erythropolis*, способных к биodeградации токсичных фенольных соединений и усиливает их рост в среде с высоким содержанием данных загрязнителей [5]. Предполагается, что сорбция ГК на клеточных стенках бактерий создает защитный слой, позволяющий выдерживать более высокие концентрации токсикантов. Внесение в среду гуминовых кислот усиливало также деградацию бактериями атразина и хинолина [6]. Установлено, что усиление деградации данных соединений было связано с повышением проницаемости мембран у использовавшихся штаммов бактерий.

Тем не менее, конкретные механизмы взаимодействия ГК с клетками микроорганизмов остаются невыясненными. Между тем, гуминовые кислоты являются постоянной составляющей почвенной среды и могут во многом определять характер функционирования почвенных микробных сообществ.

В качестве модели в работе использовались генетически модифицированные штаммы *E. coli* MG1655, содержащие плазмиды, несущие оперон luxCDABE морской фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленный под контроль промоторов KatG и RecA. Данный оперон отвечает за работу люцифераз, которые катализируют окисление длинноцепочных альдегидов. Реакция сопровождается биолюминесценцией, фиксируемой люминометром. Биосенсор с плазмидой PkatG реагирует на наличие в среде окислителей,

образующих в клетке гидроперекиси и супероксид-анион-радикал. Биосенсор с плазмидой pRecA реагирует на повреждения ДНК и ДНК-тропные агенты.

Было показано, что при добавлении ГК, полученных щелочной экстракцией вермикомпоста (после экстракции значение pH препарата было доведено до 8,0) в конечной концентрации 80 мг/л, 8 мг/л и 0,8 мг/л наблюдается усиление роста штамма KatG, что проявлялось в усилении свечения лунок без внесения индуктора на 0,91%, 29,48% и 20,65% соответственно. При этом 80 мг/л ГК начинали подавлять рост бактерий в стационарной фазе. Одновременно в вариантах с добавлением 1 мМ H₂O₂ наблюдалось достоверное снижение индукции на 26,8%, 27,56% и 18,8% (Рис. 1).

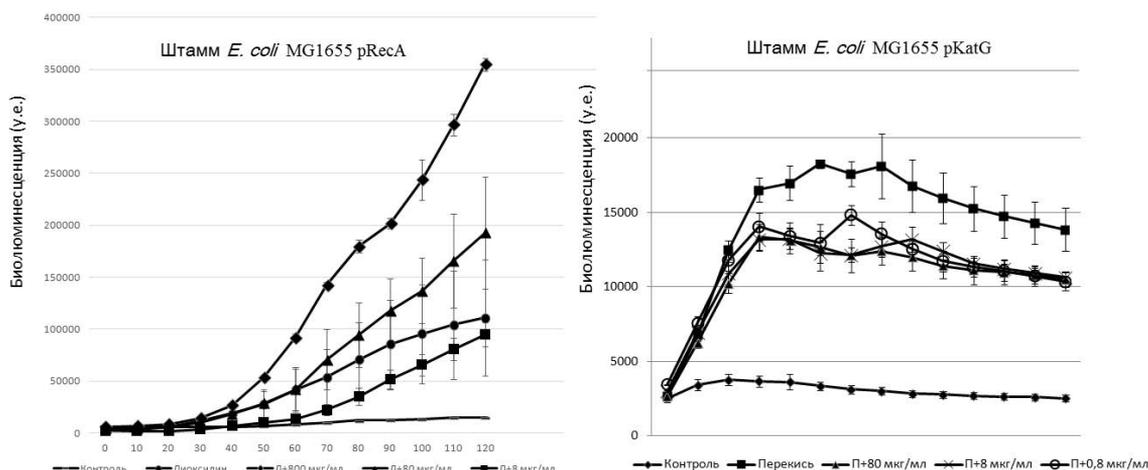


Рис. 1. Влияние гуминовых кислот на интенсивность билюминесценции штаммов *E.coli* MG1655 pRecA (индуктор диоксидин) и *E.coli* MG1655 pKatG (индуктор H₂O₂)

Поскольку гуминовые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, их проникновение в цитоплазму клеток представляется маловероятным. Можно предполагать, что протекторное действие ГК при культивировании бактерий в присутствии H₂O₂ связано со снижением уровня перекисного окисления липидов, а уменьшение затрат на биосинтез липидов обеспечивает стимуляцию роста.

Одновременно с этим, ГК потенцировали генотоксичность диоксида. Данное соединение является известным ДНК-тропным агентом, вызывающим повреждение ДНК. Поскольку ГК не способны преодолеть цитоплазматическую мембрану, можно предполагать влияние ГК на кинетику поступления диоксида в клетку. Полученные экспериментальные данные хорошо согласуются с приведенными в литературе сведениями об усилении поступления в клетки микроорганизмов некоторых низкомолекулярных веществ.

Список литературы

1. Vallini G., Pera A., M. Agnolucci, and M. Valdrighi, "Humic Acids Stimulate Growth and Activity of in Vitro Tested Axenic Cultures of Soil Autotrophic Nitrifying Bacteria," *Biol. Fertil. Soils* 24 (3), 243–248 (1997).
2. Visser, S. A. (1985b). Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4), 457–462.
3. Tikhonov, V. V., Yakushev, A. V., Zavgorodnyaya, Y. A., Byzov, B. A., & Demin, V. V. (2010). Effects of humic acids on the growth of bacteria. *Eurasian Soil Science*, 43(3), 305–313.
4. Valdrighi, M. M., Pera, A., Agnolucci, M., Frassinetti, S., Lunardi, D., & Vallini, G. (1996). Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 58(2), 133–144.

5. Feifřčová, D., Šnajdr, J., Siglová, M., Čejková, A., Masák, J., & Jirků, V. (2005). Influence of humic acids on the growth of the microorganisms utilizing toxic compounds (comparison between yeast and bacteria). *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 59(10), 749-752.
6. Meredith, C. E., & Radosevich, M. (1998). Bacterial degradation of homo-and heterocyclic aromatic compounds in the presence of soluble/colloidal humic acid. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 33(1), 17-36.

Микроорганизмы подземных вод, загрязненных нитратами и радионуклидами

Бабич Т.Л.¹, Сафонов А.В.², Назина Т.Н.¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, (Лаборатория нефтяной микробиологии), Москва

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Лаборатория химии технеция), Москва

Проведение фундаментальных исследований воздействия техногенных отходов на биоразнообразие и геохимическую деятельность микроорганизмов в пластовых водах, загрязненных жидкими радиоактивными отходами (ЖРО), и выяснение роли микроорганизмов в миграции и концентрировании урана и трансураниевых элементов и преобразовании нитратов является актуальной и важной задачей в рамках обеспечения экологической безопасности в районах захоронения радиоактивных отходов.

На протяжении многих лет на территории Сибирского химического комбината (АО «СХК», г. Северск, Томская обл.) для сбора и хранения ЖРО использовалось специальное гидротехническое сооружение – бассейн Б-2 [1]. Из-за фильтрации ЖРО через стенки и дно бассейна произошло загрязнение подземных вод радионуклидами, нитратами и другими токсичными компонентами ЖРО. Микробное сообщество подземных экосистем может оказывать существенное воздействие на геохимические параметры пластовых вод и непосредственно на компоненты РАО. Поэтому в настоящее время большой научный и практический интерес представляет получение сведений о численности и разнообразии микробного сообщества подземных вод, загрязненных радионуклидами и нитратами, а также о влиянии микроорганизмов на формы нахождения и подвижность радионуклидов в этих экосистемах. Высокое содержание нитрат-ионов в подземных водах в районе бассейна Б-2 обусловило необходимость поиска денитрифицирующих бактерий, способных переводить нитраты в экологически безопасный молекулярный азот или газообразные оксиды азота.

Объектом исследования служили пробы пластовых жидкостей из контрольных скважин, расположенных в верхнем водоносном горизонте (глубина 10 м) в зоне естественного движения пластовой жидкости, скорость которой не превышает нескольких метров в год. Пробы представляли собой смесь природных подземных вод и растворов из поверхностного хранилища РАО. В работе использовали микробиологические, аналитические, электронно-микроскопические и молекулярно-биологические методы.

Определена численность культивируемых микроорганизмов основных физиологических групп в составе микробного сообщества. В этом подземном олиготрофном местообитании выявлены микроорганизмы, способные участвовать в осуществлении реакций циклов углерода, азота и железа, в том числе, аэробные органотрофные (10^5 – 10^8 кл/мл) и нитрифицирующие бактерии (1-й и 2-й фазы), и анаэробные бродильные (10 – 10^8 кл/мл), денитрифицирующие (10^5 – 10^8 кл/мл), железоредуцирующие бактерии и представители группы Анаммокс.

Сульфатредуцирующие и метанобразующие микроорганизмы не выявлены в подземных водах, вероятно, вследствие окисленной обстановки из-за высокого содержания нитрат-ионов в водах. Полученные результаты свидетельствуют о присутствии в природных пластовых водах малочисленной, но метаболически разнообразной микробиоты.

Тотальная ДНК, выделенная из пробы подземной воды, служила в качестве матрицы для амплификации V3–V4 гиперварибельного региона гена 16S рРНК и последующего высокопроизводительного секвенирования. Впервые в РФ для проб загрязненных радионуклидами и нитратами подземных вод получена библиотека, содержащая 25 тысяч фрагментов последовательностей генов 16S рРНК. Распределение генов 16S рРНК в полученной библиотеке Б-2-41 представлено на гистограмме (рис. 1).

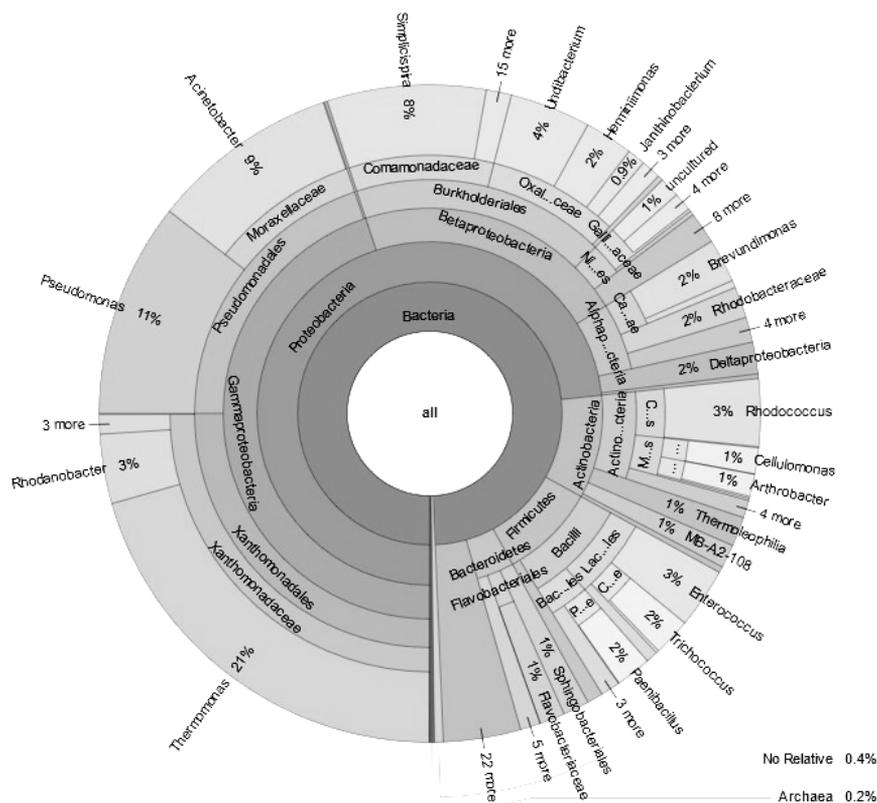


Рис. 1. Распределение фрагментов последовательностей генов 16S рРНК в библиотеке, созданной на основе ДНК микроорганизмов подземной воды из скважины Б-2-41

Фрагменты последовательностей, выявленные в библиотеке, были разделены на филоциты, имеющие не менее 97% сходства последовательностей.

Кроме того, получены чистые культуры аэробных органотрофных и денитрифицирующих бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Thermomonas*. Выявлена способность этих бактерий не только восстанавливать нитраты, но и уменьшать окислительно-восстановительный потенциал среды, тем самым снижая растворимость урана и других радионуклидов, способствуя их иммобилизации. Наилучшие результаты показали бактерии, принадлежащие видам *Microbacterium oxydans* штамм SHC-3-5 и *Thermomonas fusca* штамм SHC-3-19.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №16-03-00153).

Список литературы

1. Сафонов А.В., Ильин В.А., Трегубова В.Е., Захарова Е.В., Ершов Б.Г., Бабич Т.Л., Назина Т.Н. Биологические противомиграционные барьеры в подземных водоносных горизонтах при консервации хранилищ жидких радиоактивных отходов // Вопросы радиационной безопасности. – Озерск: ФГУП ПО «Маяк», 2015. – № 3 (79). – С. 99-105.

Создание генно-инженерной конструкции на основе *rol*-генов *Agrobacterium rhizogenes* для получения косматых корней методом биобаллистической трансформации

**Симахина А.С., Ясыбаева Г.Р., Гуменко Р.С.,
Саргалиева Г.М., Баймиев А.Х.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Ri (root induce) плаزمида фитопатогенной грамтрицательной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* содержит в своей Т-ДНК генетическую информацию, способную индуцировать образование косматых корней у двудольных растений. Т-ДНК агропинового типа состоит из двух фрагментов, обозначенных TL (левый фрагмент) и TR (правый), которые переносятся независимо друг от друга [5]. Гены, индуцирующие рост косматых корней, локализованы во фрагменте TL-ДНК, тогда как гены синтеза опинов (источников питания агробактерии) в области TR-ДНК. Встраивание *rol*-генов (*rolA*, *B*, *C* и *D*), входящих в состав фрагмента TL-ДНК, нарушает нормальное функционирование организма-хозяина за счет изменения гормонального баланса, что в свою очередь приводит к неопластическому росту косматых корней [3]. Стоит отметить, что каждый из этих *rol*-локусов вносит свой вклад в нарушение естественного хода развития трансгенного растения. Например, *rolB* является индуктором формирования корней, изменения вторичного метаболизма растений, стимулирует наработку ауксин-связывающих белков. Биохимическим маркером генетически трансформированной культуры служит способность к образованию опинов, что обусловлено встраиванием в хромосому определенных участков TR-области *Ri* плазмиды почвенной бактерии, обеспечивающих тем самым поддержание условий для существования. Благодаря тому, что у трансгенных образцов увеличивается чувствительность ауксиновых рецепторных белков, изменяется гормональный статус клетки, и растение становится независимо от экзогенно вводимых ростовых веществ.

Культура косматых корней имеет ряд фенотипических признаков, например, таких как высокий темп роста на безгормональной среде, способность к активному образованию боковых корней вследствие нарушения апикального доминирования и утрата геотропической ориентации. Параллельно с этим в условиях *in vitro* корни сохраняют генетическую стабильность и способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения вторичных метаболитов – терпеноидов, алкалоидов, гликозидов, фенолов, и др, которые в дальнейшем могут использоваться для изготовления лекарственных препаратов или применяться в других отраслях промышленности. Все это кардинально отличает их от культуры не дифференцированно растущих клеток и тканей и повышает их практическую значимость.

Следует отметить, что в природных условиях вирулентность бактерии *Agrobacterium rhizogenes* не проявляется по отношению к однодольным и голосеменным растениям, а

также для ряда двудольных, относящихся к некоторым семействам (например, *Brassicaceae*, *Papaveraceae*), в связи с этим стандартные методики трансформации с помощью *A.rhizogenes* в этих случаях не эффективны. Таким образом, для получения косматых корней у растений, не поддающихся агробактериальной трансформации, следует использовать иные [2; 5], не требующие культивирования совместно с *A.rhizogenes*, более сложные способы введения Т-ДНК в растительные клетки. Одним из таких перспективных способов может стать биобаллистическая трансформация (biolistic transformation) – метод прямого введения чужеродных генов в клетку-рецепиента с использованием специальной установки. Принцип метода состоит в том, что на частички химически инертного металла (вольфрама, золота или платины) осаждается ДНК клетки-донора, а затем они разгоняются в установке с использованием электрического заряда или давления газа гелия и направляются в растительные ткани. Частички металла попадают внутрь растительной клетки, доставляя в них генетический материал [1]. Исходя из вышесказанного, целью данной работы стало создание генно-инженерной конструкции, содержащей все 4 *rol*-гена на основе вектора pCambia 1305.1 с репортерным геном GUS для дальнейшей биобаллистической трансформации.

В работе использован генетический материал бактерии *Agrobacterium rhizogenes* штамма A4. Фрагмент ДНК агробактерии размером 5401 п.н., содержащий гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, был амплифицирован из плазмидной ДНК *A. rhizogenes* при помощи LR Plus полимеразы (Силекс, Россия). В работе был использован бинарный вектор pCambia 1305.1, содержащий гены устойчивости к антибиотикам канамицин (Km) и гигромицин *hptII* (гигромицин фосфотрансферазы II), а также репортерный ген β-глюкуронидазы (GUS). Расщепление вектора проводили при помощи эндонуклеазы рестрикции SmaI в буфере, рекомендованном фирмой-поставщиком (New England Biolabs, США). Лигирование осуществляли при помощи T4 ДНК-лигазы (“Силекс”, Россия), реакция проводилась при +4С в течение ночи. Полученной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма XL-blue. Клонирование фрагмента ДНК агробактерии размером 5401 п.н. в бинарный вектор pCambia 1305.1 осуществляли с помощью стандартных методов химической трансформации. Для анализа наличия вставки в рекомбинантной плазмиде использовали ПЦР со специфичными праймерами к генам *rolB* и *rolC*. Качество и количество выделенных препаратов определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. На данном этапе ведутся работы по отбору рекомбинантной плазмиды, содержащей все 4 *rol* гена.

Список литературы

1. Данилова С. А. Методы генетической трансформации зерновых культур // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 5. С. 645–658;
2. Кузовкина И. Н. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целевого растения / Кузовкина И. Н, Вдовитченко М. Ю // Физиология растений. -М.:Наука, 2011. т.Том 58,N N 5.-С.787-796;
3. Павлова О.А. Rol-гены *Agrobacterium rhizogenes*/ Павлова О.А., Матвеева Т. В, Лутова Л.А // Экологическая генетика. 2013. Т. XI. №1.С. 59-68;
4. Хандри А.Е, Спайк Г., Бисселинг Т, Бревин Н. Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирования // *Rhizobiaceae: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями* // Ред. Спайнк. и др. Пер. под ред. Тиханович И.А., Проворова Н.А. СПб., 2002;
5. Spena A., Schmulling T., Koncz C., Shell J.S. Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants // *EMBO J.*, 6. 1987. P 3891 -3899.

Особенности динамики титра колифагов нормофлоры гусят в первые семь недель жизни

**Скобликов Н.Э.¹, Осепчук Д.В.², Москаленко Е.А.¹,
Авдиенко В.В.^{1, 3}, Зимин А.А.³**

¹ ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства (Лаборатория микробиологии)

² ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства (Лаборатория кормления)

³ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Исследованы особенности динамики титра колифагов (бактериофагов *E.coli*) нормофлоры 10 гусят в возрасте от 3 до 47 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 12-кратно с интервалом 3-6 дней. Всего было отобрано и исследовано 120 проб.

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

Из 120 проб бактериофаги выделялись в доступном для детекции титре на культуре *E. coli BL 21* лишь в 45 пробах. При этом фаги выделялись в возрасте в возрасте 3-9 дней у 6-8 птиц, в возрасте 12, 30 и 33 дней всего у 1 птицы, в возрасте 37 и 40 дней – у двух птиц, в возрасте 44 дней – у 5 птиц. Наибольшие показатели содержания колифагов отмечены в возрасте 6 дней (подъём на два порядка за три дня), после чего отмечалось критическое падение до неопределяемых значений к возрасту 12 дней.

В результате исследования особенности динамики титра колифагов у гусят первых 7 недель жизни, что представляет собой новые данные, полезные для общего понимания становления нормофлоры птиц в онтогенезе, её биоразнообразия и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов и кормовых добавок.

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

Особенности динамики титра *E. coli* нормофлоры гусят в первые семь недель жизни

**Скобликов Н.Э.¹, Осепчук Д.В.², Москаленко Е.А.¹,
Авдиенко В.В.^{1, 3}, Зимин А.А.³**

¹ ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства (Лаборатория микробиологии)

² ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства (Лаборатория кормления)

³ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Исследованы особенности динамики титра *E.coli* (коли-титра) нормофлоры 10 гусят в возрасте от 3 до 47 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 12-кратно с интервалом 3-6 дней. Всего было отобрано и исследовано 120 проб.

После отбора пробы взвешивались, ресуспендировались в буферном растворе. Из супернатанта производили высеив на селективную среду Эндо, посев инкубировался при 37°C в течение 24 ч. После подсчёта образовавшихся колоний коли-титр в образце рассчитывали в 1g КОЕ/мл. Дальнейшую идентификацию штаммов *E.coli* проводили по спектру биохимических признаков и по составу жирных кислот, определяемых на газовом хроматографе *Agilent Technologies*.

Из 120 проб штаммы *E.coli* выделялись в доступном для детекции титре на среде Эндо лишь в 93 пробах. При этом отмечены два возрастных периода, характеризующихся снижением высеиваемости штаммов *E.coli*: в возрасте 9-19 дней штаммы *E.coli* выделялись лишь у 6 птиц, а в возрасте 30 дней – лишь у 3 птиц. Также отмечались характерные подъёмы и снижения детектируемого коли-титра.

В результате исследования изучены особенности динамики титра *E.coli* у гусят первых 7 недель жизни, что представляет собой новые данные, полезные для общего понимания становления нормоформы птиц в онтогенезе, её биоразнообразия и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов и кормовых добавок.

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

Морфологический анализ сальмонеллезных бактериофагов

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

¹ Кафедра внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, факультет ветеринарной медицины, Пермская государственная сельскохозяйственная академия

² Лаборатория структурной адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Summary. Chugunova EO, Suzina NE, Zimin AA Morphological analysis of *Salmonella* bacteriophages. Materials of the 3rd Pushchino School-Conference "Biochemistry, physiology and biosphere role of microorganisms," 5 - 9 December 2016, Pushchino, Moscow region, Russia. New bacteriophages were isolated from pathological material of mice infected by *Salmonella* spp.. All studied phage lysates are containing *Salmonella* phages of the order *Caudovirales* of two families. Various phages of *Myoviridae* family in these lysates were presented by A1 Bradley morphotype. They have long tails 50 - 120 nm and capsid from 50 up to 100 nm in diameter. The total length of phages varied in the two ranges from 125 to 170 nm and up to 185 - 210 nm. Some lysates were containing bacteriophages of *Siphoviridae* family. These phages were presented by B1 Bradley morphotype. They carried or straight or curved tail. Tail length ranged from 120 up to 270 nm in different phages. Capsid size ranged from 35 up to 80 nm. The total length of bacteriophages of *Siphoviridae* family in these lysates varied in the range of 175 up to 330 nm.

Введение. В классификации фагов используют около 40 критериев, причем для выделения отдельных родов и видов бактериофагов нет никаких универсальных морфологических признаков. Большую роль в понимании классификации и морфологии фагов играет трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Результаты ее лежат в основе морфологической (морфотипической) классификации бактериофагов. Данная классификация было предложена в 1960е годы Бредли (1) и А.С. Тихоненко (2,3), но и, как бы это ни было парадоксально, используется в полной сохранности до настоящего времени и новые геномные данные не опровергают, а только поддерживают ее.

Материалы и методы. Для получения фагов использовали референтные и полевые штаммы сальмонелл (*S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. virchow*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. hamburg*), полученные из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России и выделенные из мясных продуктов, а также из трупов животных. Материалом для исследований служили бактериофаги, собранные из патологического материала от зараженных сальмонеллами мышей. Работа по выделению бактериофагов проведена в ГБУВК «Пермский ветеринарный диагностический центр» г. Пермь в период 2014-15 гг. Электронная микроскопия выполнена в ИБФМ РАН в 2016 г.

Результаты. Анализируя результаты ТЭМ пришли к выводу, что изучаемые лизаты содержали фаги отряда *Caudovirales*, в том числе вирионы по морфологическим свойствам характерные для фагов семейства *Myoviridae*. Изучаемые частицы были представлены А1 морфотипом Бредли и состояли из способного к сокращению хвостового отростка длиной 50...120 нм и капсида в форме икосаэдра диаметром 50...100 нм. Размер фагов варьировал от 125...170 нм до 185...210 нм (рис. 1), у некоторых вирионов были хорошо заметны хвостовые фибриллы. Бактериофаги отличались друг от друга по строению отдельных дискретных структур элементов, по соотношению капсида и стержня. Часть лизатов содержала бактериофаги, которые по морфологическим признакам мы отнесли к семейству *Siphoviridae*. Данные фаги были представлены В1 морфотипом Бредли и состояли из прямого или изогнутого хвоста длиной 120...270 нм и икосаэдрического капсида диаметром 35...80 нм (рис. 2). На правой фотографии виден бактериофаг, размер головки которого может говорить об очень маленькой длине его генома. В такую головку может поместиться геном длиной не более 10000 н.п. Для кодирования белков образующих головку и хвост такого бактериофага требуется ДНК длиной не менее 20000 п.н., то есть в два раза больше, чем может поместиться в такой капсид.

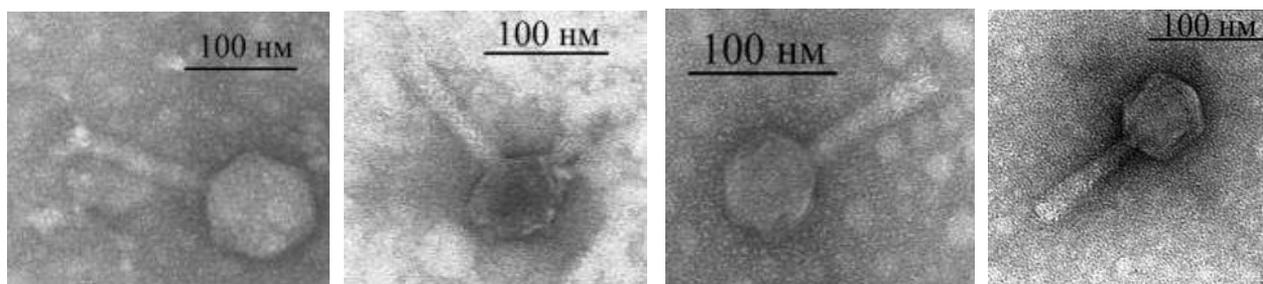


Рис. 1. Электронная микроскопия фагов семейства *Myoviridae* x50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

Например, такова суммарная длина генов ответственных за синтез структурных белков вириона у бактериофага лямбда, тоже принадлежащего к семейству *Siphoviridae* (4). Но нахождение подобного вириона в лизате сальмонелл не является, вероятно, парадоксальным. У другой энтеробактерии, *E.coli*, давно обнаружена система бактериофагов P2-P4, где бактериофаг P4 зависит в своем развитии от экспрессии генов бактериофага P2. Бактериофаг P4 является при этом как бы паразитом бактериофага P2, который кодирует вирионные белки (5). Геном бактериофага P4 при этом составляет длину в 14000 п.н. Более того сравнительно недавно обнаружено, что геном бактериофага P4 в виде P4-плазмиды может быть укорочен и образует при упаковке головки меньшего размера, чем бактериофаг P4 дикого типа (6).

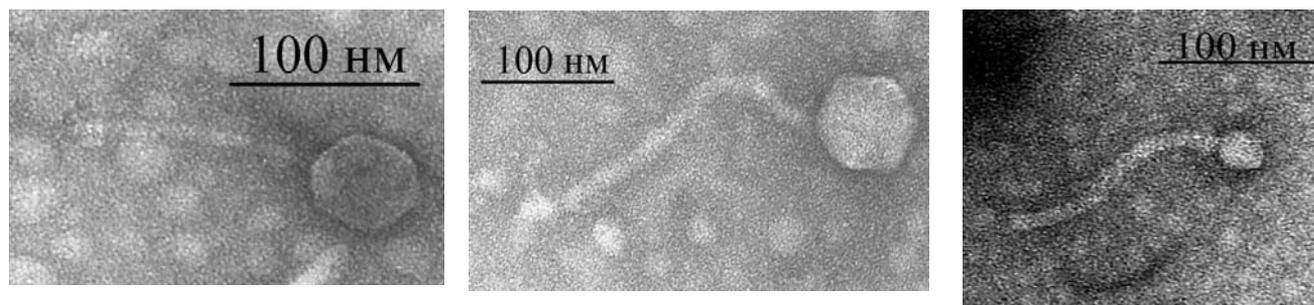


Рис. 2. Электронная микроскопия фагов семейства *Siphoviridae*.
X 50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

Размер бактериофагов семейства *Siphoviridae* варьировал в пределах от 175 до 330 нм.

Вывод. Таким образом, нами выделены и классифицированы бактериофаги двух морфологических типов: А1 и В1, принадлежащих семействам *Myoviridae* и *Siphoviridae*.

Список литературы

1. Bradley DE. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope. J R Microsc Soc. 1965 Sep;84(3):257-316. Review.
2. Ультраструктура вирусов бактерий. Тихоненко А.С. Издательство «Наука», Москва, 90 с., Ред. ак. Энгельгардт В.А.
3. Ultrastructure of Bacterial Viruses Tikhonenko Trans, from Russian by B.Haigh. Plenum Press, New York, 1972
4. Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. J Mol Biol. 1982 Dec 25;162(4):729-73.
5. Rishovd S, Lindqvist B. Bacteriophage P2 and P4 morphogenesis: protein processing and capsid size determination. Virology. 1992 Apr;187(2):548-54.
6. Kim KJ, Song J. Isolation and characterization of the smallest bacteriophage P4 derivatives packaged into P4-size head in bacteriophage P2-P4 system. J Microbiol. 2006 Oct;44(5):530-6.

Краткая характеристика новых нитевидных бактериофагов, обнаруженных в фаголизате, обогащенном сальмонеллами серотипа *Choleraesius*

Чугунова Е.О.¹, Сузина Н.Е.², Зимин А.А.³, Прохорова Т.С.⁴

¹ Кафедра внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, факультет ветеринарной медицины, Пермская государственная сельскохозяйственная академия

² Лаборатория структурной адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

⁴ Кафедра инфекционных болезней, факультет ветеринарной медицины, Пермская государственная сельскохозяйственная академия

Summary. Chugunova EO, Suzina NE, Zimin AA, Prokhorova TS. Brief description of the new filamentous phages found in the phage lysate enriched by *Salmonella* of serotype Choleraesius. Materials of the 3rd Pushchino School-Conference "Biochemistry, physiology and biosphere role of microorganisms," 5 - 9 December 2016, Pushchino, Moscow region, Russia. Phage lysates were obtained from bacteria of pathological material of mice infected by *Salmonella*. Phage lysates were prepared by the mixtures of different *Salmonella* serotypes, including one enriched by *Salmonella* Choleraesius

serotype. In the lysate phago-like particles resembling to bacteriophages of *Inoviridae* family of morphotype F1 (by Bradley) were detected. On the TEM image objects were visible from 600 up to 1000 nm in length and about 35 nm in thick. It should be noted that the thickness of the phage like particles varies considerably from the particle thickness of bacteriophages of f1 phage group.

Введение. Около 96 % известных фагов принадлежит порядку Caudovirales - хвостатые фаги, включающего семейства Myoviridae, Siphoviridae и Podoviridae (1). Однако на сегодняшний день известно 13 семейств, порядок которых не определен. В данный перечень входят фаги семейства Inoviridae, известными и хорошо изученными представителями которого являются фаги M13 и fd. В частности нитевидный бактериофаг M13 сыграл существенную роль в становлении и развитии методологии рекомбинантных ДНК. Широкое использование бактериофага M13 в экспериментальной практике молекулярно-биологических исследований связано, прежде всего, с особенностями его жизненного цикла. В процессе воспроизводства геномная ДНК проходит стадию двухцепочечной репликативной формы. Отличительной чертой морфогенеза нитевидных бактериофагов является то, что вирион собирается не внутри бактерии, а на мембране. По мере выхода из клетки одноцепочечная ДНК покрывается белками оболочки, и вновь собранные частицы секретируются во внеклеточное пространство. Зараженная клетка не лизируется фагом, продолжает расти, хотя и с несколько меньшей скоростью. Фаг не теряет жизнеспособность при широком варьировании размеров генома, что позволяет использовать его в качестве вектора для клонирования (2 - 4).

Цель работы. Провести поиск нитевидных бактериофагов в лизатах сальмонелл различных серотипов.

Результаты поиска. Возможные фагоподобные частицы, которые могут представлять собой бесхвостые бактериофаги были обнаружены нами посредством трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии в фаголизате, обогащенном сальмонеллами серотипа Choleraesuis. На снимке видны объекты длиной 600...1000 нм и около 35 нм толщиной, по морфологии напоминающие бактериофаги семейства Inoviridae морфотипа F1, которые, как известно, представляют фаги в форме длинных гибких нитей, а их геном представлен одноцепочечной кольцевой молекулой ДНК. Надо заметить, что толщина этих фагоподобных частиц существенно различается с толщиной частиц бактериофагов группы фага f1.

Заключение. Особую актуальность дальнейшей работы видим в получении чистых линий выделенных фагов и использовании их для создания диагностических тест-систем методом фагового дисплея, суть которого заключается в экспонировании пептидов и белков на поверхности инфекционной частицы нитевидного бактериофага путем экспрессии чужеродного генетического материала в виде слитого с одним из его покровных белков единого полипептида (2).

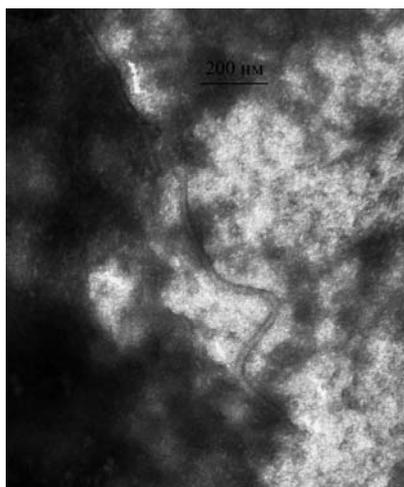


Рис. 1. Электронная микроскопия частиц (предположительно фаги семейства Inoviridae) x 30000. Масштабная линейка 200 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

Применение мультилокусного тандемного филогенетического анализа для идентификации природных изолятов и коллекционных культур грибов

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

Отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов» ИБФМ РАН

Одновременное использование молекулярных и морфологических методов идентификации штаммов грибов становится парадигмой современной микологии. Утверждаются общепризнанные стандарты молекулярного типирования, в соответствии с которыми первым стандартом баркодирования для грибов является регион ITS, включающий два транскрибируемых спейсера и ген небольшой структурной субъединицы рибосом 5,8S [1]. В экологических исследованиях часто ограничиваются именно типированием по баркоду, не претендуя на корректные филогенетические построения. Для таксономической характеристики культур прибегают к мультилокусному анализу различных генов, из числа которых выбирают таксоноспецифические баркоды второго порядка [2].

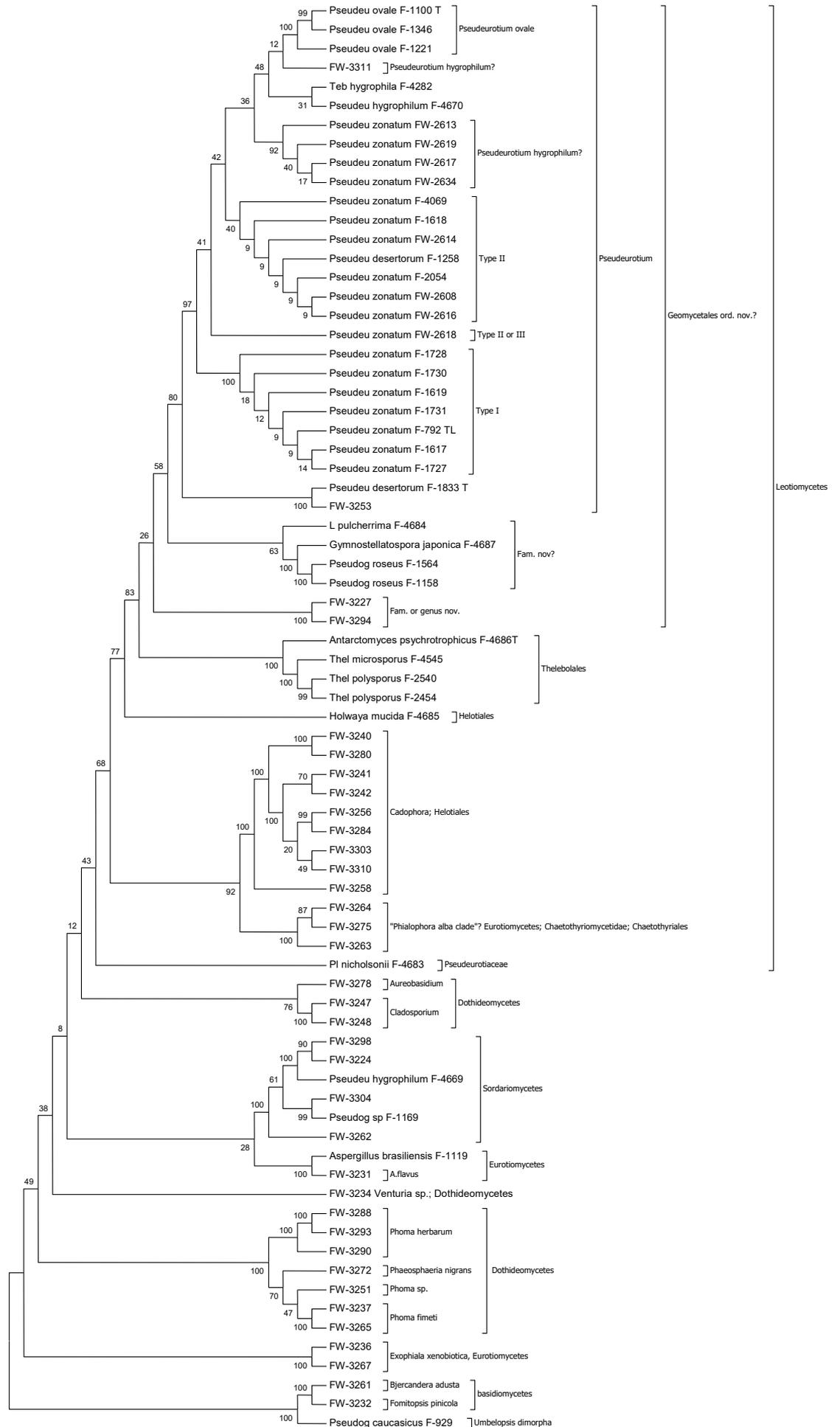
В данной работе мы показали удобство и методическую мощь филогенетического анализа по участку рибосомной ДНК, включающему тандемно расположенные локусы ITS, ген 5,8S, ITS2, и часть гена 28S субъединицы рибосом, включающий относительно вариабельные регионы D1, D2 и D3. Общая длина такого макро-локуса примерно 1500 п.н. Биоинформатический анализ (Primer-BLAST) показал, а практика подтвердила, что этот участок в большинстве случаев может быть амплифицирован при помощи одной пары довольно универсальных "пан-фунгальных" праймеров ITS5 - LR5, и с ними же возможно встречное секвенирование по дидеокси-технологии Сэнгера. Драфт-контиги получались уже из двух ридов. Качественные контиги с покрытием от двукратного и выше получали при помощи секвенирования с внутренних праймеров ITS4 и LR0R. В необходимых случаях для ПЦР и секвенирования использовали также и другие праймеры (ITS1-F, LR3 и др.). В работе использовали 32 изолята из основного фонда ВКМ (ВКМ F-) и 54 из рабочей коллекции Лаборатории мицелиальных грибов ВКМ (ВКМ FW-). Филогенетический анализ проводили при помощи пакета MEGA6 [3] методами максимального подобия и максимальной экономии со статистическим анализом устойчивости узлов 100-кратным бутстраппингом.

Молекулярно-таксономические суждения делали на основе анализа древа (рисунок 1) и данных n-BLAST против базы нуклеотидных последовательностей DDBJ/ENA/GenBank с особым вниманием к типовым, образцовым и аннотированным последовательностям.

Основные находки на филогенетическом древе.

1. Около половины штаммов, изолированных из грунта Антарктиды в этой работе, принадлежит к классу *Leotiomyces* O.E. Erikss. et Winka, 1997. Этим объясняется и интерес к коллекционным представителям этого класса.

2. Штаммы морфотипа *Pseudeurotium zonatum* J.F.H. Веума 1937 (18 шт. и один свежий изолят) сформировали несколько клад, одна из которых (Type I) содержит штаммы, молекулярно наиболее близкие к типовому. Другие можно рассматривать как промежуточные формы между первой и кладами *Pseudeurotium ovale* Stolk 1955 и *Pseudeurotium hygrophilum* (Sogonov et al.) Minnis et D.L. Lindner 2013, включая штаммы, практически сливающиеся с последним. Следует рассмотреть возможность описания одного-двух новых видов и уточнения диагноза для ряда коллекционных штаммов *Pseudeurotium zonatum*.



3. Типовой штамм *Pseudeurotium desertorum* Mouch. 1971 ВКМ F-1833 образовал тесную кладу с культурой ВКМ FW-3253, зато нетиповой ВКМ F-1258 мигрировал к *P. zonatum* Type II. В целом род *Pseudeurotium* выглядит монофилетическим.

Рис 1. Филогенетическое дерево, полученное методом максимальной экономии. Тандем локусов рибосомной ДНК: часть 18S; ITS1, 5,8S и ITS2 полностью и часть 28S (включает домены D1-D3). Устойчивость узлов оценивали методом бутстраппинга (100 повторений).

4. Два штамма *Pseudogymnoascus roseus* Raillo 1929 образовали кладу, к которой *Gymnostellatospora japonica* Udagawa 1993 и *Leuconeuropsora pulcherrima* (G. Winter 1876) Malloch et Cain 1970 примыкают теснее, чем к *Pseudeurotium*. Возможно, в дальнейшем удастся показать, что эта группа является более естественным кандидатом на образование сестринского семейства по отношению к *Pseudeurotiaceae*, чем на прямое членство в последнем. Вместе эти две клады явно сестринские по отношению к кладе порядка *Thelebolales*, что служит новым аргументом в пользу выделения порядка *Geomycetales* ord. nov. Между указанными большими кладами есть также небольшая третья, образованная двумя изолятами из Антарктиды. Эта кладка выглядит кандидатом на образование таксона ранга не ниже рода или семейства.

5. Далее в рамках класса просматривается прочно связанная пара клад, одна из которых является хорошо выраженным монофилетическим родом *Cadophora*, а вторая - кладка из близких к *Phialophora alba* J.F.H. Веума 1943 штаммов (все из Антарктиды). В настоящее время *Phialophora alba* не относят к классу *Leotiomycetes*, но настоящие данные позволяют рассмотреть такую возможность.

6. *Pleuroascus nicholsonii* Masee et E.S. Salmon 1901 не образовал выраженной связи с родом, к которому он "приписан", данных по нему немного, что делает его вероятным таксономическим эмергентом, требующим внимания.

7. Несколько клад из культур Антарктического происхождения, слабо связанных с основой древа и принадлежащих к трем классам аскомицетов, уверенно определяются бластом.

8. Естественная внешняя группа - два базидиомицета из Антарктиды и *Pseudogymnoascus caucasicus* Sejr et Milko 1966 ВКМ F-929 (T), оказавшийся в результате давней ошибки культурального манипулирования грибом *Umbelopsis dimorpha* Mahoney et W. Gams 2004.

Вывод: Использование праймеров ITS5 и LR5 не является новым, они известны давно [4, 5]. Но в настоящее время, благодаря накоплению полногеномных сиквенсов в базах данных и средств машинного анализа, мы объективно оцениваем удачные или неудачные находки прошлых лет. Технологии секвенирования, даже по Сэнгеру, продолжают совершенствоваться в приборной и химической части, что продолжает удешевлять процесс и увеличивать длину и качества чтений. Это сделало ампликон длиной в 1500 п.н. вполне удобной мишенью для технологичного чтения в больших работах. Идея мультилокусного единого ампликона сама по себе хороша, - она ускоряет и удешевляет работу, снижая необходимое количество манипуляций, снижая вероятность ошибки также и за счет невозможности ошибочно собрать неправильный химерный контиг. Данную систему можно широко рекомендовать, чтобы она стала повсеместным рабочим стандартом характеристики грибных штаммов и рабочим инструментом в экологических исследованиях. По сути это "усиленный баркод", намного превосходящий по информативности стандартный баркод ITS. Филогенетический анализ вполне возможен на этой базе, но узлы высоких порядков остаются плохо поддержанными, что не отменяет эвристический потенциал данного подхода. Очевидно, что развитие технологий "длинного" секвенирования типа SMRT может востребовать подобную технологию для метагеномики.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-29-02629-офи.

Список литературы

1. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V.109(16): 6241-6. doi: 10.1073/pnas.1117018109.
2. Peterson S.W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V.95: 339. doi:10.1007/s00253-012-4165-2.
3. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molec. Biol. Evol. 2013. V.30: 2725-2729.
4. Bruns T.D., White T.J., Taylor J.W. Fungal molecular systematics // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1991. V.22: 525-564.
5. Bruns T.D., Vilgalys R., Barns S.M., Gonzalez D., Hibbett D.S., Lane D.J., Simon L., Stickel S., Szaro T.M., Weisburg W.G., Sogin M.L. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences // Molec. Phylog. Evol. 1992. V.1: 231-241.

Влияние комбинированных магнитных полей на магнетотактные бактерии

Хохлова Г.В.¹, Архипова О.В.², Филатова И.Ю.³, Вайнштейн М.Б.¹

¹ Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Магнетотактными называют бактерии, способные ориентироваться и перемещаться вдоль силовых линий геомагнитного поля. Клетки таких бактерий содержат различное количество магнетосом – наноразмерных железосодержащих органелл, окруженных мембранами. Уникальные по свойствам магнетосомы играют существенную роль в 1) механизмах клеточной биоминерализации; 2) при геологических исследованиях в качестве биомаркеров; 3) в лечении и диагностике заболеваний (доставка лекарств, МРТ).

Целью исследования было определение влияния комбинированных магнитных полей (КМП) на магнетотактные бактерии: на потребление ими железа и нитратов, на активность нитратредуктазы при анаэробном росте, на общий уровень транскрипции *tamY* и *mgI458*, участвующие в процессе формирования магнетосомы.

Объектами исследования были культуры бактерий: *Rhodospirillum rubrum* ВКМ В-1621 и выделенный из гематитовых отложений (Карелия) *Pseudomonas gessardi* штамм KhG, у которых нами было обнаружено образование внутриклеточных частиц и/или визуально заметная реакция суспензии на прилагаемый магнит. Стандартом в работах по изучению экспрессии белков под действием КМП служила культура *Magnetospirillum gryphiswaldense* DSMZ 6361 (MSR-1). Характеристики использованных КМП представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристики КМП, использованных в экспериментах

Вариант КМП	Магнитное поле, Т		Частота, Гц	Поле по частоте резонансно к:
	Постоянная, В _{DC}	Переменная, В _{АС}		
КМП-Р	46,80	86,11	807,0	фосфору
КМП-Fe	46,80	86,11	38,30	железу
КМП-N	53,30	98,07	164,0	азоту

Потребление железа бактериями в КМП и геомагнитном поле. Содержание железа анализировали в клетках *R. rubrum*. Элементный состав сожженной биомассы определяли на плазменном эмиссионном спектрометре. Анализ показал, что потребление бактериями железа в КМП больше, чем в параллельном варианте в геомагнитном поле, при этом потребления железа при экспонировании в КМП, настроенных на резонанс к фосфору или к железу, различались незначительно: средняя остаточная концентрация в среде, мг Fe/л, составила 0,93 для геомагнитного поля и 0,46 и 0,50 для КМП-Р и КМП-Fe.

Потребление нитратов бактериями в КМП и геомагнитном поле. В экспериментах с КМП-Р и КМП-Fe в анаэробных условиях в темноте нитраты были единственным источником энергии для *R. rubrum*, поэтому их убыль являлась показателем активности бактерий. Потребление нитратов бактериями определяли по разнице между исходной и конечной концентрациями в среде (в супернатанте после отделения биомассы), измерения проводили на ионном хроматографе (844 UV/VIS Compact IC). Сравнение результатов показало, что потребление нитратов в КМП возрастает по сравнению с геомагнитным полем. Средняя убыль нитратов (мМ) в среде составила: 0,50 для геомагнитного поля, 0,60 и 0,70 для КМП-Р и КМП-Fe, соответственно, при среднем квадратичном отклонении 0,10.

Нитратредуктазная активность под действием КМП. Активность нитратредуктазы измеряли по скорости обесцвечивания восстановленного бензилвиологена в анаэробных условиях перед экспериментом, после воздействия КМП-Fe, КМП-N и в контрольных образцах, находившихся в геомагнитном поле (Рис.1). КМП-Fe повышало скорость восстановления нитрата в 2 раза по сравнению с таковой до помещения клеток в поле (рис. 1а). КМП-N частично ингибируют нитратредуктазную активность у *P. gessardii* относительно контроля и клеток до эксперимента (рис. 1б). КМП-Fe, как и геомагнитное поле, ингибирует активность нитратредуктазы по сравнению с таковой до внесения в поле у *R. rubrum* (рис. 1в). КМП-N, в отличие от геомагнитного поля, не оказывает влияния на скорость восстановления нитрата у *R. rubrum* (рис. 1г).



Рис. 1. Нитратредуктазная активность в клетках *P. gessardii* (а,б) (а - влияние КМП-Fe в сравнении с геомагнитным полем; б - влияние КМП-N в сравнении с геомагнитным полем) и в клетках *R. rubrum* (в, г) (в - влияние КМП-Fe в сравнении с геомагнитным полем; г - влияние КМП-N в сравнении с геомагнитным полем)

Определение общего уровня транскрипции с промоторов генов оперонов *tamXU* и *tms6* магнетосомного островка было выполнено при помощи обратной транскрипции и ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени (RT-PCR). Для этого из клеток *M. gryphishvaldense*, культивируемых в условиях КМП-Fe и в геомагнитном поле (контроле) в течение суток, выделяли тотальную РНК. Методом обратной транскрипции, при помощи праймеров, комплементарных нуклеотидным

последовательностям генов *tamY* и *mgI458*, была получена кДНК. Далее полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения RT-PCR. Уровень транскрипции определяли по значениям порогового цикла (Cp). В качестве нормировочного гена выбран ген домашнего хозяйства *groS*. Были получены результаты (рис. 2), указывающие на то, что в условиях КМП-Fe и в контроле транскрипция с обоих генов *tamY* и *mgI458* идет одинаково, что говорит об отсутствии эффекта выбранных условий КМП. Надо отметить, что экспрессия белка *tamY* выше почти в 2 раза, что может свидетельствовать о начальном этапе образования магнетосом в клетке.

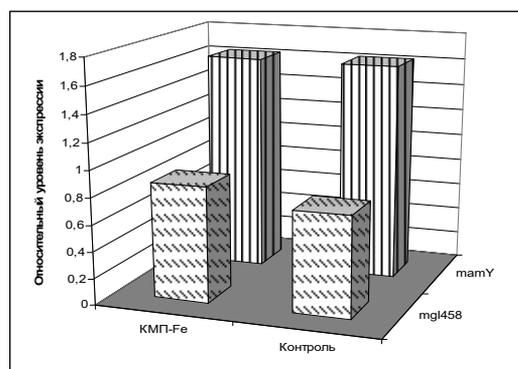


Рис. 2. Определение общего уровня транскрипции с промоторов генов оперонов *tamXY* и *tmsb* магнетосомного островка в условиях КМП-Fe и геомагнитном поле

Заключение. КМП воздействуют на бактериальную активность, в частности на потребление нитратов и железа. Активность нитратредуктазы либо возрастала, либо ингибировалась, что зависело от вида бактерий и от характеристик КМП. Не было отмечено влияние КМП на общий уровень транскрипции с промоторов генов оперонов *tamXY* и *tmsb* магнетосомного островка по сравнению с геомагнитным полем.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-04-03022-а.

Влияние растительных масел на синтез арахидоновой кислоты *Mortierella alpina*

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

¹ Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Пуштинский государственный естественно-научный институт

Арахидоновая кислота (АК, C20:4, омега-6) характеризуется уникальными биологическими свойствами и находит широкое применение в медицине и диетпитании, является необходимым компонентом питательных смесей для грудных детей, а также применяется в сельском хозяйстве в качестве стимулятора иммунитета растений к фитопатогенам. Ограниченность природных источников АК (печень и надпочечная железа животных, желток куриных яиц) диктует необходимость развития ее микробиологического производства с использованием активных продуцентов и дешевых возобновляемых углеродных субстратов. Наиболее распространенными продуцентами АК являются мицелиальные грибы *Mortierella alpina*. Ранее нами было показано, что

отселекционированные штаммы *M. alpina* способны синтезировать АК с использованием в качестве дешевого углеродного субстрата отходов производства биодизеля, содержащих глицерин и примеси жирных кислот растительных масел [1]. Литературные данные о влиянии растительных масел на синтез полиненасыщенных жирных кислот довольно противоречивы [2–4].

Целью настоящей работы было исследование влияния добавок растительных масел к глицерин-содержащей среде на синтез АК штаммом *Mortierella alpina* NRRL-A-10995.

Грибы выращивали в периодическом режиме на минеральной среде, содержащей нитрат калия (1.5 г/л), глицерин (3%) и 1% растительных масел (pH 6.0) при температуре 24°C в течение 7 и 10 суток. Использовали следующие растительные масла: рапсовое, содержащее почти равные количества олеиновой и линолевой кислот (46.4 и 43.5% соответственно); подсолнечное, с преобладанием линолевой кислоты (67.7%); оливковое, с преобладанием олеиновой кислоты (75.8%) и льняное, с преобладанием альфа-линоленовой кислоты (55.4%). Жирнокислотный состав липидов анализировали методом газожидкостной хроматографии после предварительного кислотного метанолиза жирных кислот.

Установлено, что в присутствии растительных масел биомасса *M. alpina* увеличилась по сравнению с контролем в 1.6–1.9 раз на 10-е сутки роста (рис. 1). Доля липидов в биомассе возросла в 1.2–1.9 раза на 7 сут и снизилась до контрольного уровня на 10-е сутки. В присутствии растительных масел в составе жирных кислот значительно возросло содержание олеиновой и линолевой кислот; на 10-е сутки роста на среде с рапсовым маслом их доля увеличилась примерно в равной степени (179. и 152% от контроля), на среде с подсолнечным маслом увеличилось преимущественно содержание линолевой кислоты (189% от контроля), а на среде с оливковым маслом – олеиновой кислоты (202% от контроля). На среде с льняным маслом в составе липидов обнаружена чуждая для данных грибов альфа-линоленовая кислота (12.3%). Как видно на рис. 1, доля АК в липидах *M. alpina* в присутствии растительных масел составляла на 10-е сутки роста 65–76% от контроля; однако, с учетом более высокой плотности биомассы, содержание АК в пересчете на 1 л среды было выше, чем в контроле (108–136%).

Ранее нами был предложен метод увеличения доли АК в липидах *M. alpina* в 2–2.5 раза от начального уровня за счет метаболизации внутриклеточных жирных кислот путем инкубирования мицелия при комнатной температуре [1]. Поскольку при культивировании

грибов на средах с растительными маслами в составе липидов значительно возрастает доля кислот–предшественников АК (олеиновой и линолевой), применение данного метода для увеличения доли АК в липидах представляет значительный интерес.

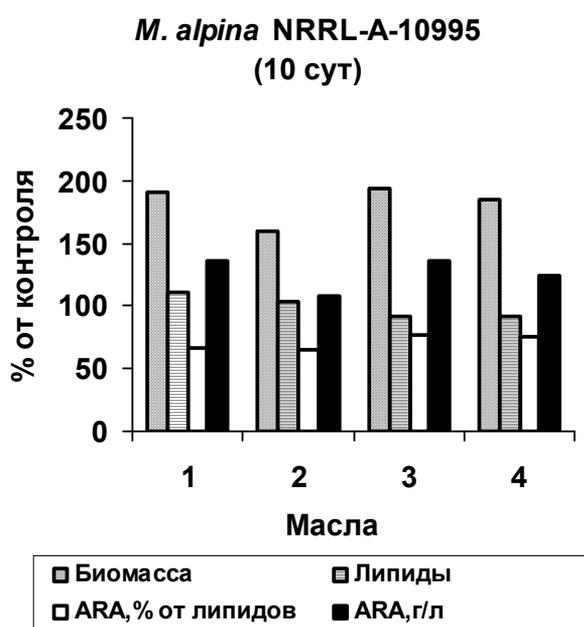


Рис. 1. Влияние растительных масел: рапсового (1), подсолнечного (2), льняного (3) и оливкового (4) на рост *M. Alpina* NRRL-A-10995, синтез липидов и арахидоновой кислоты

Таким образом, установлено, что при культивировании *M. alpina* NRRL-A-10995 на средах с растительными маслами значительно возрастает плотность биомассы и увеличивается доля жирных кислот, преобладающих в составе масел. Несмотря на снижение доли АК в липидах, ее содержание в расчете на 1 литр среды возрастает по сравнению с контролем. Можно рекомендовать использовать растительные масла в качестве углеродного субстрата при микробиологическом получении АК.

Список литературы:

1. Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Mironov A.A., Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Vainshtein M.B.//Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014. V. 116. P. 429–437.
2. Shinmen Y., Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Yamada H.//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. P. 11–16.
3. Kendrick A., Ratledge C.//J. Am. Oil Chem. Soc. 1996.V. 73. P. 431–435.
4. Certik M., Baltieszova L., Sajbidor J.//Lett. Appl. Microbiol. 1997. V. 25. P. 101–105.

Метод поэтапного отбора биохимических реакций для формирования заданных метаболических путей

Минкевич И.Г.

Лаборатория физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН
e-mail: minkevich@ibpm.pushchino.ru

Продолжена разработка вычислительного процесса, приводящего к теоретическому нахождению альтернативных метаболических путей образования заданного продукта из заданного субстрата. Информационной основой таких вычислений является локальная база данных, содержащая список биохимических реакций — потенциальных участников метаболических путей, их стехиометрические коэффициенты, сведения об их обратимости или необратимости, элементный состав всех веществ — участников этих реакций. Математической основой выбора реакций для метаболических путей является система стехиометрических уравнений $\sum_{r=1}^R v_{kr} z_r = b_k$, где v_{kr} — стехиометрическая матрица всей совокупности реакций, содержащихся в локальной базе данных, z_r — искомые потоки через реакции, b_k — потоки обмена системы с внешней средой. Для реакций, не участвующих в данном метаболическом пути $z_r = 0$. Часть реакций необратима, и для них имеют место ограничения: $z_r \geq 0$.

Нами разработаны принципы выделения из совокупности b_k тех величин, которые следует считать изначально неизвестными и находить после того, как определены все потоки z_r . Тогда часть уравнений системы $\sum_{r=1}^R v_{kr} z_r = b_k$ временно исключается из нее, а оставшаяся часть этой системы с матрицей N (сокращенная матрица v_{kr}) содержит больше неизвестных, чем уравнений. Это приводит к возможности существования альтернативных метаболических путей. Система уравнений приобретает вид $N\vec{z} = \vec{\beta}$, где вектор $\vec{\beta}$ — это вектор \vec{b} без исключенных компонент.

Сформулирован способ решения преобразованной таким образом системы стехиометрических уравнений путем разделения матрицы N на две, $N = (A \ C)$, и

компонент вектора переменных \vec{z} также на два вектора, $\vec{z} = (\vec{x} \ \vec{y})^T$, где \vec{y} — произвольно задаваемые скорости реакций, а \vec{x} — вычисляемые скорости. Ограничения $z_r \geq 0$ соответственно разделяются на две совокупности: $x_{n_r} \geq 0$ и $y_{l_r} \geq 0$, поскольку необратимые реакции оказываются среди компонент \vec{x} , и \vec{y} .

Было показано, что часть ограничений $x_{n_r} \geq 0$ описывается параллельными плоскостями в пространстве $\{y\}$. Анализ расположения таких плоскостей и областей $x_{n_r} > 0$ позволил разработать метод снижения числа реально действующих ограничений. Было обнаружено существование совпадающих друг с другом ограничительных плоскостей с противоположной локализацией областей допустимых ненулевых значений скоростей двух или более необратимых реакций. Это означает, что для данного субстрата и продукта значения некоторых скоростей реакций из множества \vec{x} фиксированы и не зависят от выбора значений задаваемых скоростей \vec{y} . Часто такие фиксированные значения x_{n_r} равны нулю (такая реакция в метаболических путях не участвует). Аналогичные взаимоотношения существуют и между ограничениями обоих видов: $x_{n_r} \geq 0$ и $y_{l_r} \geq 0$, и тогда фиксированными являются как x_{n_r} , так и y_{l_r} . Наконец, обнаружено, что матрица, используемая при нахождении решения \vec{x} с заданным \vec{y} , содержит строки, состоящие только из нулей. Соответствующие x_{n_r} также оказываются фиксированными. Фиксированные переменные определяются еще до окончательного вычисления полного решения, что является особенностью данной задачи.

После нахождения фиксированных переменных их значения подставляются в систему уравнений $N\vec{z} = \vec{\beta}$, в результате чего размерность неизвестного вектора \vec{z} сокращается. Затем все вышеупомянутые операции по анализу оставшихся ограничений и выявлению фиксированных переменных повторяются. Это делается циклически, пока новые фиксированные переменные и новые лишние ограничения не перестают обнаруживаться.

Заключительная часть процесса вычислений состоит в том, что находятся излишние реакции, первоначально найденные как участники метаболических путей. Эти реакции образуют замкнутые на себя цепи, либо никак не влияющие на превращение субстрата в продукт, либо образующие футильные циклы. Излишние реакции затем удаляются из найденных, как описано выше, метаболических путей. После этого проверяется наличие повторяющихся вариантов, и повторы также удаляются, оставив только один из совпадающих вариантов путей.

В качестве примера приведем параметры процесса нахождения метаболических путей образования сукцината из двух молекул этанола. Система $N\vec{z} = \vec{\beta}$ содержит 95 неизвестных потоков через реакции z_r и 84 уравнения. При первом цикле нахождения фиксированных переменных z_r обнаруживается 16 таких переменных. После других циклов их общее число таково: 26, 40, 50 и, наконец, 71. Остается 24 неизвестных и 16 уравнений. В конечном счете получается единственный вариант метаболического пути 2Этанол→сукцинат, выбранный из принятой в данном примере локальной базы данных.

Описанный подход показал себя как эффективное средство для теоретического предсказания метаболических путей.

Список литературы

1. Минкевич И.Г. 2014. Неполные системы линейных уравнений с ограничениями на переменные. Компьютерные исследования и моделирование. Т. 6. № 5. С. 719-745. http://crm.ics.org.ru/uploads/crmissues/crm_2014_5/14507.pdf.
2. Minkevich I.G. 2015. Stoichiometric synthesis of metabolic pathways. Компьютерные исследования и моделирование. Т. 7. № 6. С. 1241–1267. http://crm.ics.org.ru/uploads/crmissues/crm_2015_6/15.07.07.pdf

**Ацидотолерантные сульфатвосстанавливающие бактерии
как основа-биопрепарата для профилактики и лечения
ацидоза рубца коров**

Рыжманова Я.В.¹, Центроев З.М.², Щербакова В.А.¹

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Пуштинский государственный естественно-научный институт

Основной причиной ацидоза крупного рогатого скота (КРС) является усиленное силосное кормление с повышенным содержанием в кормовом рационе высококрахмалистых концентратов, вызывающее изменение состава микрофлоры в рубце. В результате происходит быстрое накопление в рубце коров D-лактата, приводящее к стремительному снижению кислотности содержимого рубца, что приводит к развитию различных стадий ацидоза и шлейф попутных болезней: ламинит, кетоз, жировое перерождение и абсцессы печени, маститы. До настоящего времени не разработаны эффективные меры борьбы с D-лактатным ацидозом. Решением проблемы может стать введение в кормовые смеси жвачных животных анаэробных микроорганизмов, утилизирующих лактат и стабилизирующих кислотность содержимого рубца.

Известно, что сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) способны потреблять лактат и являются естественной микрофлорой рубца коров и овец (Coleman, 1960; Cummings et al., 1995; Wetzels et al., 2016). Однако эти микроорганизмы являются строгими анаэробами, что затрудняет их практическое использование.

Цель настоящего исследования состояла в поиске ацидотолерантных штаммов СВБ, способных утилизировать лактат в условиях рубца КРС.

Скрининг чистых культур сульфатредукторов из коллекции лаборатории анаэробных микроорганизмов и ВКМ ИБФМ РАН, способных метаболизировать лактат в условиях ацидоза рубца (рН 5.5-6.0 и температуре 37°C) показал, что штаммы *Desulfovibrio desulfuricans* В-1799, *Desulfohalobium retbaense* DSM 5692 и *Desulfovibrio fructosivorans* В-1801 были способны использовать лактат при значениях рН от 6.0 и выше. Был осуществлен поиск ацидотолерантного штамма СВБ в содержимом рубца больного ацидозом животного, в результате которого был выделен штамм RY1. По данным филогенетического анализа штамм RY1 является новым штаммом вида *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* (99.7% сходства по гену 16S рНК). *Desulfovibrio* sp. RY1 способен использовать лактат, малат, пируват, формиат и аланин в качестве доноров электронов в присутствии сульфата. Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм *Desulfovibrio* sp. RY1 использует сульфит, тиосульфат, фумарат, нитрат, а также восстанавливает Fe(III) без видимого роста с образованием 1.47 мМ Fe(II). Исследуемый изолят не требует добавления в среду ионов Fe²⁺, Mg²⁺, Na⁺, а также витаминов и дрожжевого экстракта, однако их присутствие значительно стимулирует его рост. Для

Desulfovibrio sp. RY1 характерен рост в диапазоне Na^+ 0-0.34 М (оптимум 0.086 М), pH 5.5-8.0 (оптимум 7.0) и температур 18-45°C (оптимум 37°C).

Подбор способов сохранения и иммобилизации клеток *Desulfovibrio* sp. RY1 показал нецелесообразность использования лиофилизации ввиду крайне низкого процента выживаемости клеток и длительного лаг-периода (72-120 ч). В итоге был подобран способ щадящей иммобилизации биомассы штамма *Desulfovibrio* sp. RY1 в Са-альгинатном геле, который обеспечивал сохранение культуры в активном состоянии и высокий процент (95%) выживаемости клеток.

Использование СББ в качестве биопрепарата для профилактики и лечения ацидоза рубца может оказать отрицательное воздействие на организм животного из-за выделяющегося в процессе метаболизма сероводорода (H_2S). Но этот негативный эффект можно уменьшить введением в кормовую смесь Fe_2SO_4 для удаления образующегося сульфида путем выпадения нерастворимого осадка в виде FeS .

Предварительные опыты на больных ацидозом животных во ВНИИ животноводства имени Л.К. Эрнста показали, что препарат иммобилизованных в Са-альгинатном геле клеток *Desulfovibrio* sp. RY1 повышал значения pH на 0.4, что позволяет судить об возможной эффективности применения микроорганизмов в лечении и профилактике ацидоза коров.

Список литературы:

1. Coleman G.S. A sulfate-reducing bacterium from the sheep rumen // J. Gen. Microbiol. -1960. -V.22. -p. 423-436.
2. Cummings B. A., Caldwell D.R., Gould D.H., Hamar D.W. Identity and interactions of rumen microbes associated with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia in cattle // American journal of veterinary research. -1995. -V.56. №10. -p. 1384-1389.
3. Wetzels S.U., Mann E., Metzler-Zebeli B.U., Pourazad P., Kumar M., Klevenhusen F., Schmitz-Esser S. Epimural indicator phylotypes of transiently-induced subacuteruminal acidosis in dairy cattle // Frontiers in microbiology. -2016. -V.7. Article 274.

Анализ геномов автотрофных метаногенов, выделенных из многолетнемерзлых отложений различного возраста

Ошуркова В.И., Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.

Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

Свидетельства обнаружения жизнеспособных микроорганизмов в многолетнемерзлых отложениях Арктики появились еще в XIX веке. По современным представлениям их возраст определяется возрастом пород, в которых эти микроорганизмы обнаруживаются: геологическими условиями местонахождения, историей формирования мерзлых толщ, и подтверждаются радиоуглеродными датировками. Тем не менее, природа длительной жизнеспособности обнаруживаемых организмов и механизмы их адаптации к отрицательным температурам не имеют исчерпывающего объяснения. Интерес к микроорганизмам, существующим в таких экстремальных условиях, постоянно возрастает также ввиду большой экологической значимости низкотемпературных микробных экосистем для биосферы Земли, поскольку такие экосистемы играют важную роль в формировании ее климата. Ключевым звеном низкотемпературных экосистем являются метаногенные археи, которые, перерабатывая органические субстраты, являются источником парниковых газов в атмосфере.

Ранее из многолетнемерзлых отложений Арктики различного возраста нами были выделены два водородиспользующих метаногена, представляющих новые виды *Methanobacterium arcticum* M2 VKM B-2371 (Shcherbakova et al., 2011) и *M. veterum* МК4 VKM B-2440 (Krivushin et al., 2010). Геномы этих архей секвенированы, и их драфты помещены в GenBank (NZ_JQJK00000000.1 и NZ_JQKN01000001.1, соответственно). Цель нашей работы состояла в биоинформационном анализе полученных данных и сравнении геномов, исследуемых метаногенов.

Сравнение геномов метаногенов, выделенных из мерзлых грунтов, между собой и полным геномом *Methanobacterium lacus* AL-21 (Cadillo-Quiroz et al., 2014), выделенным из болотистых отложений тундры, показало некоторые различия в организации исследуемых геномов. Так, *M. veterum* и *M. arcticum* имели одинаковый набор ферментов метаболизма метана и отличались только одной копией гена 5,10-метилентетрагидрометанооптерин редуктазы. В то же время, геном *M. lacus* AL-21 отличался от геномов мерзлотных метаногенов отсутствием каталазы и аланинацилтрансферазы, а также меньшим количеством копий некоторых генов ферментов, участвующих в образовании метана. Ферменты дегидрогеназа, глицин гидроксиметилтрансфераза, ацетат-СоА лигаза и, особенно, СоВ-СоМ гетеросульфид редуктаза у *M. lacus* AL-21 представлены в геноме большим количеством копий генов по сравнению с *M. veterum* МК4 и *M. arcticum* M2. В геномах водородиспользующих метаногенов обнаружены белки теплового и холодного шока, способствующие выживаемости в условиях низких температур.

Определение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* показало, что сходство целых геномов *M. veterum* МК4 и *M. arcticum* M2 составляет 31.30%, что близко значению уровня реассоциации ДНК, определенному по температуре плавления и составляющему 40%. Этот результат подтверждает их принадлежность к разным видам рода *Methanobacterium*.

Полученные результаты показали, что происхождение метаногенов, выделенных из вечной мерзлоты и находящихся в условиях отрицательных температур разное время, слабо повлияло на организацию их геномов. В то же время, мы обнаружили значительные различия в составе генов, отвечающих за метаболизм метана у метаногенов, выделенных из многолетнемерзлых отложений, и *M. lacus*, выделенного из тундровых отложений.

Новая психротрофная бактерия из холодного источника в Северном Прибайкалье: описание *Duganella psychrophila* sp.nov.

**Чувильская Н.А.¹, Дамбинова Е.Ц.¹, Трошина О.Ю.¹,
Рыжманова Я.В.¹, Арискина Е.В.², Щербакова В.А.¹**

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Отдел Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ РАН

Холодные минеральные источники Северного Прибайкалья (Буксыхен-Глазной, Буксыхен-Сердечный, Буксыхен-Желудочный, Буксыхен-Печеночный) известны своими целебными свойствами. Воды этих источников характеризуются постоянной низкой температурой (от 3.1 до 6.2°C), нейтральной или слабощелочной реакцией среды (рН 7.4-8.6), низкой минерализацией (до 0.1 г/ куб. дм) и окисленными условиями (Eh +142 - +340 мВ). Целью настоящей работы было выделение и характеристика новой протеолитической бактерии штамм BuS-21, выделенной из донного осадка источника Буксыхен-Сердечный.

Штамм BuS-21 был выделен методом предельных разведений на чашках Петри в анаэробных условиях. Клетки изолята представляли собой короткие палочки (1.2-1.4 × 0.3-0.4 мкм), одиночные или в парах, подвижные. Клетки окрашивались по Граму отрицательно. Полученные результаты показали, что штамм BuS-21 способен расти при температурах от 4 до 28°C (оптимум 15°C) и, следовательно, является психротрофом. Штамм рос в широком диапазоне pH (4-10), с оптимумом pH 8.0, и был толерантен до 100 г/л NaCl в среде культивирования с оптимальным ростом при 1-5 г/л. Для изучения физиолого-биохимических свойств штамма BuS-21 использовали стандартизированные тест-системы API 50 CH и API Zyme (BioMerieux, Франция), включающие тест-стрипы, содержащие 49 субстратов. Используемые штаммом субстраты даны в описании предложенного вида. Штамм BuS-21 рос как в анаэробных, так и в аэробных условиях, что свидетельствует о том, что изолят относится к группе факультативно-анаэробных бактерий. Полученная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма BuS-21 длиной 1399 н.о. была депонирована в GenBank под номером KX890231. Штамм BuS-21 представляет собой отдельную ветвь среди организмов рода *Duganella*, относящегося к семейству *Oxalobacteraceae* в филуме *Betaproteobacteria*. Наиболее близким к штамму BuS 21 был *D. zoogloeoides* IAM 12670^T (сходство 97.3%). Убихинон 8 (Q-8) был единственным дыхательным хиноном у штамма BuS-21. Содержание Г+Ц пар в ДНК составило в среднем 63.5 мол.%. Основные фенотипические признаки, дифференцирующие штамм BuS-21 от типовых штаммов близкородственных видов рода *Duganella*, приведены в таблице 1. Как видно из таблицы, штамм существенно отличается от близкородственного и других видов рода *Duganella* на фенотипическом уровне – по оптимальной температуре роста и способности расти в анаэробных условиях. Таким образом, полученные в ходе исследования результаты позволяют предложить первый психротрофный и факультативно-анаэробный вид этого рода.

Duganella psychrophila sp.nov. Клетки – подвижные палочки с закругленными концами (1.2-1.4 × 0.3-0.4 мкм), одиночные или в парах. По Граму окрашиваются отрицательно. Колонии достигают 1-2 мм в диаметре, круглые, маслянистые, выпуклые, кремового цвета. Факультативный анаэроб. Температурный оптимум роста 15°C, штамм растет при 28°C и не растет при 37°C; pH диапазон роста 5.0-10.0 (оптимум 8.0). Оптимум солености 1-5 г/л, диапазон 0-100 г/л. Не гидролизует крахмал, желатину; не образует сероводород и индол. Утилизирует глицерин, эритритол, L-арабинозу, рибозу, галактозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, сорбозу, рамнозу, инозитол, маннитол, сорбитол, α-метил-D-манозид, α-метил-D-глюкозид, эскулин, салицин, целлобиозу, мальтозу, мелибиозу, сахарозу, трегалозу, раффинозу, ксилитол, ликсозу, D- и L-фукозу, D-арабитол, пептон, триптон и дрожжевой экстракт. Убихинон 8 (Q-8) единственный дыхательный хинонон. Преобладающие полярные липиды – фосфатидилглицерин (PG) и фосфатидилэтанолламин (PE). Содержание ГЦ-пар в ДНК составляет 63.5 мол.%. Типовой штамм: BuS-21^T = ВКМ В-3064^T, выделен из донных осадков источника Буксыхен-Сердечный, Бурятия, Россия.

Таблица

Дифференцирующие признаки штамма BuS 21^T и типовых штаммов близкородственных видов рода *Duganella*

Характеристика	BuS-21 ^T	<i>Duganella zoogloeoides</i> IAM 12670 ^T	<i>Duganella ginsengisoli</i> DCY83 ^T
Размер клеток, мкм	0.3-0.4 × 1.2-1.4	0.6-0.8 × 1.8-3.0	0.5-0.6 × 1.5-2.0
Способность к анаэробному росту	+	-	-

рН пределы оптимум	5.0-10.0 8.0	н.о. 7.0	6.0-8.0 7.0
Температура, °С пределы оптимум	4 – 28 15	н.о. 25-30	4 – 40 30
NaCl, г/л пределы оптимум	0 – 100 1-5	н.о. 1	0-40 1
Г+Ц в ДНК, мол. %	63.5	63-64	55.3
Авторы описания	Наши исследования	Freidman <i>et al.</i> , 1968	Zhang <i>et al.</i> , 2016

н.о. – не определяли

Список литературы

1. Friedman, B. A., Dugan, P. R., Pfister, R. M. & Remsen, C. C. Fine structure and composition of the zoogloeal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*. J Bacteriol.- 1968. – V. 96. – P. 2144–2153.
2. Zhang, J., Kim, Y. J., Hoang, V. A., Nguyen, N. L., Wang, C., Kang, J. P., & Yang, D. C.
3. *Duganella ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng soil. Intl J Syst Evol Microbiol.- 2016. – V. 66. – P. 56-61.

Психрофильные железовосстанавливающие бактерии из холодных источников Северного Прибайкалья

Захарюк А.Г.¹, Дамбинова Е.Ц.²

¹ Лаборатория анаэробных микроорганизмов ИБФМ РАН

² Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Россия)

Железо является четвертым самым распространенным элементом в земной коре. Предполагается, что организмы так широко и разнообразно используют железо в процессе жизнедеятельности не только из-за его химических особенностей, но прежде всего из-за его распространенности и повсеместной доступности на Земле. Впервые способность микроорганизмов к облигатной железоредукции в анаэробных условиях была показана Балашовой и Заварзиным в 1979 г (Balashova, Zavarzin, 1980). В этих экспериментах бактерия, идентифицированная как *Pseudomonas* sp., восстанавливала гидроксид железа и ферригидрит молекулярным водородом. В настоящее время мезофильные (20 – 45°C) и термофильные (>45°C) железовосстанавливающие бактерии достаточно хорошо изучены. Представители родов *Geobacter* и *Shewanella* выделены из разнообразных мест обитания, включая термальные источники, морские и пресные водоемы, щелочные экосистемы (Lovley et al., 2004; Заварзина и др., 2006; Bowman et al., 1997; Nevin et al., 2005). Между тем, значительно менее изучен процесс микробной железоредукции в низкотемпературных эконисах нашей планеты и микроорганизмы, которые осуществляют этот процесс, несмотря на их очевидную экологическую и практическую ценность.

Целью нашего исследования было выявление процесса психрофильной микробной железоредукции в осадках холодных минеральных источников Северного Прибайкалья, выделение и описание новых железовосстанавливающих бактерий (ЖВБ).

Объектами данного исследования служили образцы донных осадков холодных минеральных источников Кучигер и Буксыхен, расположенных в Северном Прибайкалье (Россия). Вода в источнике Буксыхен гидрокарбонатно-кальциевая ультрапресная, с минерализацией 90 мг/л и рН 7.4 – 8.6. В источнике Кучигер состав воды: сульфатная, натриевая, гидрокарбонатная с высоким содержанием фтора (10 – 18 мг/л), сероводорода, (31 мг/л) и кремниевой кислоты (70 – 85 мг/л). рН варьирует от 7.2 до 8.7. Температура воды в исследуемых источниках независимо от сезона составляет от 3.5 до 7.5°C.

В пробах донных осадков холодных минеральных источников Северного Прибайкалья проведена оценка численности психрофильных железовосстанавливающих бактерий. Нами был зафиксирован процесс микробного восстановления железа в пробах, инкубирующихся при 7°C. Максимальные значения численности ЖВБ (10^3 кл/г осадка) зарегистрированы в донных отложениях холодного минерального источника Кучигер. Минимум (10^2 кл/г осадка) выявлен в отложениях источника Буксыхен. Были получены накопительные культуры психрофильных ЖВБ, которые анаэробно окисляли такие несбраживаемые субстраты, как ацетат натрия и формиат натрия, восстанавливая при этом до 2.0 мМ трехвалентного железа.

В ходе работы нам впервые удалось получить из пробы придонного ила холодного минерального источника Буксыхен новый штамм психрофильных ЖВБ – штамм В-G1-3, способный восстанавливать соединения железа (III) с формиатом, в качестве донора электронов и единственного источника углерода, при температуре культивирования 7.0°C. Выделенный штамм оказался алкалофилом с областью развития рН от 7.5 до 9.5 и оптимумом роста при рН 8.0. Изолят не нуждался в NaCl, однако рос в присутствии соли до 0.5%, и таким образом явился галотолерантом. Было показано, что новая бактерия проявляла железовосстанавливающую активность при использовании в качестве акцептора электронов соединения трехвалентного железа, как в растворимой форме, так и в нерастворимой форме, что, вероятно, делает его более конкурентоспособным в анаэробном микробном сообществе.

Филогенетический анализ полученной последовательности генов 16S рНК показал, что штамм В-G1-3 относится к семейству *Clostridiaceae*. Ближайшим родственником оказался штамм Iso-A⁷ (91% сходства), способный восстанавливать различные формы трехвалентного железа и относящийся к роду *Proteiniclasticum*.

Таким образом, полученные результаты показали, что в исследованных холодных местах обитания активно функционирует микробное сообщество, восстанавливающее различные соединения трехвалентного железа. Выделен и частично охарактеризован новый штамм психрофильных железовосстанавливающих бактерий, вероятно, представляющий новый род семейства *Clostridiaceae*.

Список литературы

1. Balashova, V.V., Zavarzin, G.A. (1980) Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria, *Microbiology*, 48, 635–639.
2. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction// *Adv. Microbial Physiol.* 2004. V. 49. P. 219-286.
3. Д.Г. Заварзина, Т.В. Колганова, Е.С. Булыгина, Н. А. Кострикина, Т.Н. Турова, Г. А. Заварзин *Geokalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., первый алкалофильный представитель семейства *Geobacteraceae*, выделенный из содового озера // *Микробиология*. 2006. Т. 75. С. 775-785.
4. Bowman J.P., McCammon S.A., Nichols D.S., Skerratt J.H., Rea S.M., Nichols P.D., McMeekin T.A. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. P. 1040–1047.

5. Nevin K. P., Holmes D. E., Woodard T. L., Hinlein E. S., Ostendorf D. W., Lovley D. R. *Geobacter bemidjensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 1667–1674.

Новые активности полифосфатаз *Saccharomyces cerevisiae*

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

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

Полифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* PPN1 и PPX1 кодируются негомологичными генами, различаются по субстратной специфичности, локализации в клетке и роли в метаболизме полифосфатов. Они являются полифункциональными ферментами и способны катализировать не только отщепление фосфата с конца цепи неорганических полифосфатов, но и другие реакции. Так, полифосфатаза PPX1 катализирует отщепление фосфата от аденозинтетрафосфата и гуанозинтетрафосфата, вторичных сигнальных соединений дрожжей. Полифосфатаза PPN1 проявляет эндополифосфатазную активность, расщепляя длинноцепочечные полифосфаты на короткие фрагменты. С помощью сконструированных в совместной работе с Институтом Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН рекомбинантных штаммов-суперпродуцентов полифосфатаз были получены высокоактивные и стабильные препараты полифосфатаз PPN1 и PPX1, которые использовали для более детального изучения субстратной специфичности обоих ферментов. Обнаружена новая активность полифосфатазы PPN1 *Saccharomyces cerevisiae*, отщепление фосфата от dATP, которая составляла ~ 14% от активности с высокомолекулярными неорганическими полифосфатами. В клетках штамма *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующего PPN1, эта активность более чем в 10 раз выше, чем у родительского штамма. Подобно экзополифосфатазной активности, dATPазная активность была оптимальна в присутствии 0,1 мМ Co^{2+} , ингибировалась гепарином и пирофосфатом. Величина K_m для dATP составила 0.88 ± 0.14 мМ.

Активности очищенных полифосфатаз дрожжей *S. cerevisiae* PPN1 и PPX1 с высокомолекулярными полифосфатами, dATP и cAMP

Фермент	Активность, Е/ мг белка		
	полиP ₂₀₈	dATP	cAMP
PPN1	300	42	0
PPX1	900	0	15

Полифосфатаза PPX1 не высвобождала P_i из dATP. Эта полифосфатаза проявляла фосфомоноэстеразную активность по отношению к cAMP. Такая активность не обнаружена у PPN1. Величина K_m для cAMP составила $3,3 \pm 0,2$ мкМ. Эта активность подавлялась 2 мМ триполифосфата на 97%, а той же концентрацией высокомолекулярных полифосфатов на 32% и стимулировалась втрое 2,5 мМ Mg^{2+} . Полученные данные представляют интерес в связи с возможным участием полифосфатаз в регуляции роста и почкования у дрожжей в первую очередь в условиях питательных лимитов и адаптации к

стрессам. Есть основания предполагать, что роль PPN1 и PPX1 в клетках дрожжей не исчерпывается гидролизом полиР, но включает участие в метаболизме других соединений.

Влияние глюкозы на порообразование в плазматической мембране дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Валиахметов А.Я.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

Барьерная функция плазматической мембраны компенсируется её селективной проницаемостью. Одним из путей поступления ионов и питательных веществ в клетку является их транспорт через поры в плазматической мембране. Влияние физиологического состояния клетки на порообразование изучено слабо. Известно, что клетки дрожжей при добавлении глюкозы кардинально меняют свой метаболизм. Целью нашего исследования было изучение влияния глюкозы на порообразование в плазматической мембране *S.cerevisiae*. Для оценки размера пор клетки окрашивали двумя красителями: этидиум бромидом (EtBr) (молекулярный радиус ~ 0,8 нм) и 70 kDa FITC-декстраном (FD) (молекулярный радиус ~ 5,8 нм).

Показано что присутствие глюкозы приводило к тому, что плазматическая мембрана дрожжей *S.cerevisiae* становилась проницаемой для FD и EtBr (Рис 1 а,b.) В присутствии глюкозы и сорбита формировалась популяция клеток, накапливающих только EtBr (Рис. 1с). Мы предполагаем образование в мембране двух типов пор: больших (от 6 нм), через которые в клетку попадает FD и EtBr; и маленьких, через которые проникает только низкомолекулярный EtBr. Интересно, что в средах, содержащих источник азота, как с глюкозой (среда YPD), так и без глюкозы (среда YP) накопление обоих красителей не наблюдалось, т.е. порообразование подавляется в присутствии источников азота.

Мы также проверили влияние преинкубации с глюкозой на эффективность электропорации клеток *S.cerevisiae*. Преинкубация с глюкозой значительно снижает количество EtBr окрашенных клеток (с 77% до 44%), но приводит к 2-кратному возрастанию количества клеток, окрашенных FD (Таблица 1). Следовательно, преинкубация с глюкозой оказывает противоположный эффект на формирование мелких и больших пор. Присутствие сорбита сильно подавляло как процесс порации так и восстановление целостности мембраны, что контролировалось по окрашиванию EtBr. В этих условиях лишь 22% клеток не преинкубированных с глюкозой и 16% клеток, преинкубированных с глюкозой накапливали EtBr. В тоже время присутствие 1М сорбита во время электропорации вызывает небольшой прирост в количестве клеток, окрашенных FD. Прирост наблюдался как после инкубации с глюкозой так и без неё (Таблица 1). Можно сделать заключение, что инкубация с глюкозой в значительной степени подавляет формирование мелких электропор и незначительно стимулирует образование больших. Эти эффекты усиливаются при наличии в среде преинкубации и порации сорбита. Через 15 мин после электропорации почти все электропоры «затягиваются».

Таблица 1

Количество клеток (в процентах от общего числа) накопивших FD или EtBr немедленно после электропорации (точка 0 мин) и через 15 мин (30 мин для FD) после электропорации

		вода		1М сорбит	
	Время, мин	- глюкоза	+ глюкоза	- глюкоза	+ глюкоза
EtBr	0	77	44	22	16
	15	14	12	12	6
FD	0	5	10	8	13
	30	2	4	8	8

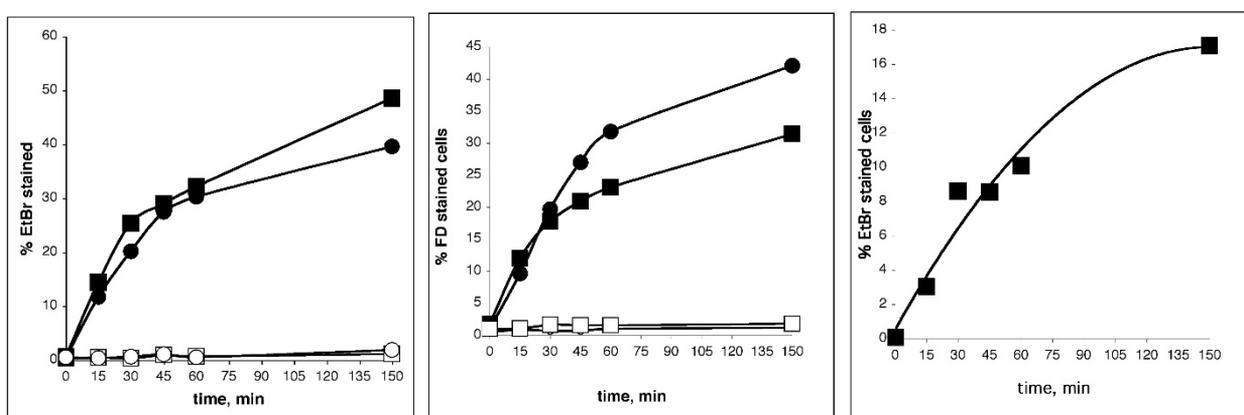


Рис.1. Влияние 100 mM глюкозы на накопление EtBr и FD в интактные клетки *S.cerevisiae*.

■- глюкоза в воде; □- вода; ●- глюкоза в сорбите; ○ – сорбит. **А** – накопление EtBr; **В** – накопление FD; **С** – накопление EtBr только через маленькие поры

Вывод

Глюкоза существенно изменяет барьерные функции плазматической мембраны дрожжей *S. cerevisiae*.

Неорганические полифосфаты в условиях фосфорилирования H⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при её активации глюкозой

Томашевский А.А., Петров В.В.

Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

H⁺-АТФаза плазматической мембраны дрожжей является протонной помпой, создающей градиент ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$), который используется для активного транспорта веществ в клетку и поддержания внутриклеточного pH и ионного гомеостаза. Функционирование H⁺-АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при добавлении глюкозы к клеткам происходит быстрое увеличение активности фермента в 5-10 раз. Показано, что активация H⁺-АТФазы дрожжей глюкозой связана с фосфорилированием остатков серина 911 и треонина 912 в С-концевом цитоплазматическом участке молекулы.

Неорганические полифосфаты (полиР) синтезируются в клетке с использованием АТФ и тесно связаны с энергетическим обменом у дрожжей. Мы предположили, что они могли бы участвовать в фосфорилировании H⁺-АТФазы. Для проверки этого предположения была поставлена задача: определить, меняется ли содержание неорганических полифосфатов при фосфорилировании H⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей при её активации глюкозой.

Для работы был выбран родительский штамм NY13 и мутантный штамм S911A, у которого в 911ой позиции серин заменён на аланин и не фосфорилируется. Характеристики роста, содержания АТФ и активности H⁺-АТФазы в присутствии глюкозы не отличаются от таковых родительского штамма, что делает его подходящим для сравнения. Клетки родительского и мутантного штаммов выращивали на среде с дефицитом фосфора и отмывали от глюкозы. Перед экстракцией полиР клетки инкубировали в неростовых условиях в присутствии и отсутствии 2% глюкозы при 30 °С в течение 15 минут.

Таблица 1

Содержание ортофосфата и полифосфатов (мкмоль/г сырой биомассы) в родительском штамме NY13 и мутантном штамме S911A *Saccharomyces cerevisiae* в отсутствии (-Г) и присутствии (+Г) глюкозы

	NY13 -Г	NY13 +Г	S911A -Г	S911A +Г
Ортофосфат	3,2 ±0,4	0,9 ±0,1	3,8 ±0,2	1,1 ±0,3
ПолиР1	1,5 ±0,15	1,7 ±0,1	1,0 ±0,05	1,9 ±0,2
ПолиР2	3,7 ±0,4	3,6 ±0,4	4,0 ±0,3	3,9 ±0,3
ПолиР3	1,8 ±0,2	1,9 ±0,3	1,9 ±0,2	2,2 ±0,3
ПолиР4-5	0,4 ±0,08	0,4 ±0,08	0,3 ±0,08	0,5 ±0,09
Сумма ПолиР	7,4 ±0,5	7,5 ±0,5	7,3 ±0,6	8,5 ±0,5

В пробах, инкубированных с глюкозой, наблюдалось снижение содержания ортофосфата, что свидетельствует о том, что он использовался для синтеза фосфорилированных сахаров и АТФ при гликолизе. Однако никакого достоверного уменьшения содержания полиР при в этих условиях не наблюдали. Напротив, у мутантного штамма происходило небольшое увеличение содержания полиР за счет фракции ПолиР1. Это увеличение можно объяснить конвертацией в полиР избытка АТФ,

который образуется в гликолизе за время инкубации, но в отличие от родительского штамма не расходуется на фосфорилирование H⁺-АТФазы.

***Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D синтезирует
внеклеточный пептид - ингибитор трипсина**

Аринбасарова А.Ю.¹, Ашин В.В.¹, Лауринавичюс К.С.², Меденцев А.Г.¹

¹ Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН

Протеазы фитопатогенных грибов играют значительную роль в развитии заболевания растений [1]. На грибах рода *Fusarium* было показано [2], что наличие трипсиноподобной активности является показателем патогенности гриба. Одним из способов контроля протеолитических ферментов является использование природных белков-ингибиторов, способных обратимо связывать протеазы в неактивный комплекс [3, 4]. Почвенные грибы рода *Trichoderma* используются в качестве биопестицидов в борьбе с фитопатогенами [5, 6]. Одним из механизмов, позволяющим контролировать численность патогенов, является способность *Trichoderma* к образованию антибиотических соединений различной химической природы.

Цель работы - показать способность *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D к синтезу ингибитора трипсина и определить некоторые свойства (молекулярная масса, активность).

Гриб выращивали на среде Чапека, содержащей (г/л): KН₂РO₄- 1.0; MgSO₄ - 0.5; KCl - 0.5; дрожжевой автолизат - 0.05. В качестве субстрата роста использовали пшеничные отруби (2%), деактивированный мицелий грибов *Trichoderma* (2%) или глюкозу (2%). Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, в течение 6 сут на качалке (220 об/мин) при 28 °С.

Протеолитическую активность трипсина определяли с 0.3% азоказеином в 0.050 М трис -фосфатном буфере (рН 7.0). Реакцию начинали добавлением азоказеина и инкубировали 30 мин при 37°С. За единицу активности принимали изменение поглощения при 440 нм, равное 0.001. Концентрация трипсина в пробе составляла 1.0, 2.5 или 5.0 10 нМ. За единицу активности ингибитора принимали уменьшение активности трипсина на 1 Е.

Ингибитор экстрагировали из культуральной жидкости этилацетатом. Экстракт выпаривали на ротонном испарителе. Сухой остаток растворяли в воде и фильтровали через мембранный фильтр ХМ-10. Очистку ингибитора проводили с помощью афинной хроматографии на Трипсин-сефарозе. Элюирование ингибитора проводили ступенчатым градиентом ацетонитрила (0-50%) в присутствии трифторацетата (0.01%). Основные фракции элюата тестировали на содержание в них пептида (по ингибированию активности трипсина).

Оценку молекулярной массы проводили на масс-спектрометре «Autoflex Speed» (Bruker) при регистрации положительных ионов в режиме рефлектрона. Образец наносили на чип и покрывали 1 мкл матрицы - насыщенного раствора альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в смеси 50 % ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonics, Германия).

Было показано, что гриб синтезировал ингибитор протеаз в процессе роста на среде с пшеничными отрубями (рис 1). Максимальное накопление пептида в среде (3.7 Е/мл)

отмечалось на 4 сут роста. Образование ингибитора обнаруживалось также при росте гриба на деактивированном мицелии гриба (2.7 Е/мл) или на глюкозе (0.1 Е/мл.).

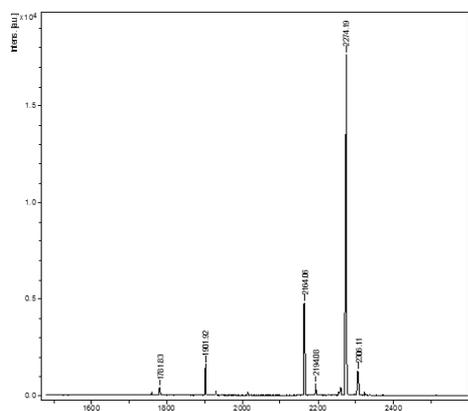


Рис. 1. Масс-спектрометрическая характеристика пептида

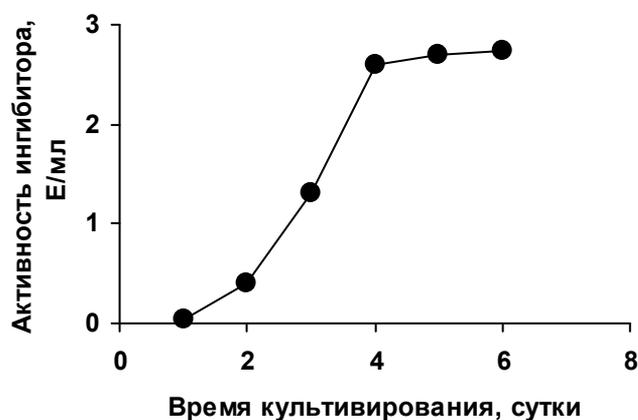


Рис. 2. Синтез ингибитора трипсина грибами *Trichoderma* при росте на среде с пшеничными отрубями

Молекулярная масса ингибитора по данным MS (MALDI-TOF) составила 2274.19.

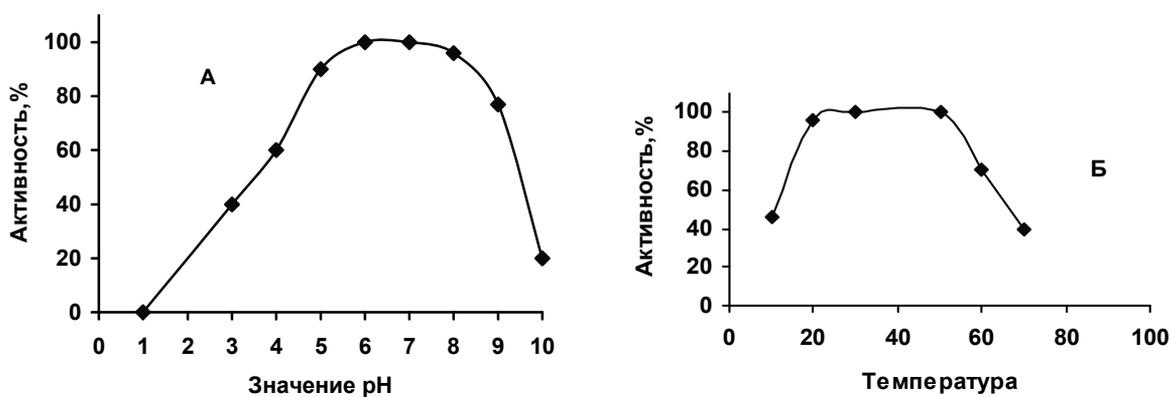


Рис. 3. Зависимость активности ингибитора от pH (А) и температуры (Б).
(Время преинкубирования - 30 мин)

Таким образом, показан синтез пептида - ингибитора трипсина грибом *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D.

Список литературы

1. Hartmann T. *et al.* Oligopeptide transport and regulation of extracellular proteolysis are required for growth of *Aspergillus fumigatus* on complex substrates but not for virulence // *Mol. Microbiol.* 2011. 82, 917–935.
2. Habib H., Fazili K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants // *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2007. 2, 68-85.
3. Dunaevsky Y.E. *et al.* Protease inhibitors: use to increase plant tolerance to insects and pathogens // *Mol. Biol. Mosc.* 2005. 39, 702-708.
4. Ryan C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1990. 28, 425-449.
5. Harman G.E. *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts // *Nature Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. P. 43–56.
6. Vinale F. *et al.* *Trichoderma*-plant pathogen interactions // *Soil Biology and Biochemistry.* 2008. P. 1–10.

**Кинетические характеристики L-лизин α -оксидазы
Trichoderma cf. aureoviride Rifai VKM F-4268D**

Аринбасарова А.Ю., Крупялко В.И., Меденцев А.Г.

Лаборатория адаптации микроорганизмов ИБФМ РАН

Интерес к L-амино оксидазам обусловлен возможностью их потенциальным использованием в биотехнологии и медицине. L-лизин α -оксидаза - один из ферментов, перспективных в энзимотерапии опухолей, основанной на чувствительности опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе, аминокислот. Фермент катализирует реакцию окислительного дезаминирования L-лизина с образованием аммиака, пероксида водорода и α -кето- ξ -аминокапроновой кислоты.

К ферментным медицинским препаратам предъявляется ряд определенных требований: наряду с биологической активностью и низкой токсичностью они должны проявлять определенные кинетические свойства, такие как высокая активность, узкая субстратная специфичность. Сочетание этих требований определяет перспективу использования многих противоопухолевых средств.

Исследования кинетических свойств L-амино оксидаз ограничиваются вычислением константы Михаэлиса-Ментен (K_m) и максимальной скорости реакции. Некоторое внимание все же уделено кинетическим механизмам, но без учета наличия нескольких субъединиц и возможной кооперативности их действия.

Цель работы – исследовать возможную кооперативность гомодимерного фермента L-лизин α -оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D и оценить константу Михаэлиса с учетом коэффициента Хилла. Необходимо также изучить субстратную специфичность, ингибирование дезаминирования лизина нерасщепляемыми аналогами лизина и продуктом реакции.

Субстратная специфичность. Мы провели сравнительное изучение взаимодействия ЛО с различными аналогами лизина. В качестве возможных субстратов или ингибиторов были протестированы лизин и другие L-аминокислоты: аргинина, лейцин, фенилаланина, цитруллин, аланина, аспарагин, гистидин, орнитин, треонин, тирозин, изолейцин, валин, глутамин и глутамовая кислота. глицин, D-лизин. Были проверены также глицин, -D-

лизин и следующие аналоги лизина: N-2-трифторацетиллизин, 2,6-диаминопимелировая кислота, 6-аминокапроновая кислота, L-2,7-диаминогептановая кислота и 1,4-диаминобутн - α -кето- ξ -аминокапроновой кислоты.

Оказалось, что фермент действует практически только на L-лизин. Кроме того, активность отмечалась в присутствии диаминопимелиновой кислоты (22%), аргинина (12.8%) и L – орнитина (8.3%). В присутствии остальных аминокислот активность фермента была равна 0. Узкая субстратная специфичность и стереоспецифичность характерны для оксидаз аминокислот из других организмов.

Некоторые нерасщепляемые аналоги лизина ингибировали превращение лизина – глутамин (3.6%); 1,4-диаминобутан (1.7 %); L-2,7-диаминогептановая кислота (29%); 6-аминокапроновая кислота (38%); L-лейцин (14%) и L-аланин (19.4%). Этот эффект может быть объяснен непродуктивным связыванием «субстрат-фермент». Более эффективным ингибитором оказалась 6-аминокапроновая кислота, у которой структура и длина углеводородного радикала сходны с таковыми у лизина. Имело место также ингибирование - α -кето- ξ -аминокапроновой кислотой - продуктом реакции.

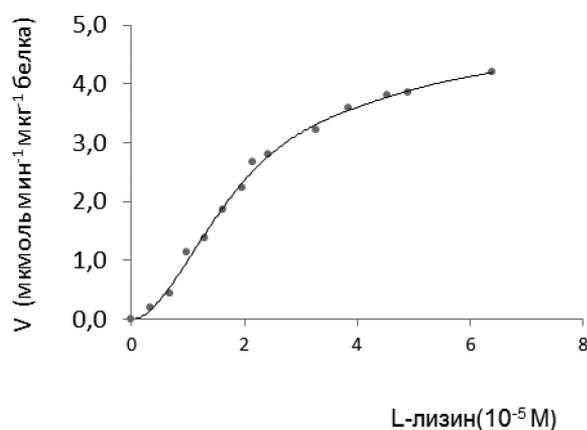


Рис. 1. Зависимость скорости реакции (V) от концентрации лизина

Как первая стадия изучения кинетики фермента была исследована зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. ЛизО гомодимерный фермент, что предполагает кооперативность связывания субстрата. Поэтому реакция описывается трех-параметрическим уравнением Хилла:

$$v_0 = V \cdot s^h / (s^h + s_{0.5}^h) \quad (1)$$

где v_0 начальная скорость реакции, V – максимальная скорость, $s_{0.5}$ -концентрация субстрат, при которой достигается половина V , h – коэффициент Хилла. В результате обработки данных с помощью программы «Statistics» (Sigma Plot 10) получено:

$$h = 2.05 \pm 0.15, \quad V = 4.36 \pm 0.14 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ мкг}^{-1} \text{ белка}, \quad S_{0.5} = (2.03 \pm 0.07) \cdot 10^{-5} \text{ М.}$$

С учетом положительной кооперативности мы предложили кинетическую схему дезаминирования лизина, которая включает параллельно-последовательное действие каждой субъединицы в каталитическом акте.



где S - молекула субстрата, $E_A = E_B$ - одинаковые субъединицы, P - продукт реакции.

Для оценки K_m мы использовали уравнение, разработанное специально для кооперативных (аллостерических) ферментов с использованием h :

$$K_{m(A)} = s_{0.5(A)}/h = s_{0.5(A)}/(1+1) \quad (2)$$

$$K_{m(A)} = 2.03[1/(1_A + 1_B)] 10^{-5} \text{M} = 2.03(1/2) \cdot 10^{-5} \text{M} = 1.015 \cdot 10^{-5} \text{M} \quad (3)$$

Вычисленная величина K_m показывает сильное связывание субстрата с активным центром каждой субъединицы ($\approx 10^{-5} \text{M}$).

Таким образом, показано, что ЛизО из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268 D - высокоселективный фермент, проявляющий положительную кооперативность, $h = 2.05$. Используя дополнительные возможности коэффициента Хилла была вычислена константа Михаэлиса – Ментен, $K_m = 1.015 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

Аллостерические эффекты затрудняют детальное изучение эффектов ингибирования превращения of L-lysine как инертными аналогами так и продуктом реакции.

Высокая аффинность, узкая субстратная специфичность и высокая активность фермента предполагают возможность терапевтического использования в клинической онкологии, а также большой потенциал для использования в биоинженерии. Кроме того, эти параметры определяют физиологическую роль внеклеточного фермента ЛизО и его участие во взаимоотношениях “*Trichoderma* – растение – патоген”.

Способ получения изолимонной кислоты с использованием рекомбинантного штамма *Yarrowia lipolytica* ACO1 в режиме отъемов-доливов

Алляров Р.К.¹, Камзолова С.В.¹, Римович В.², Моргунов И.Г.¹

¹Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

² Университет естественных наук г. Вроцлав (Польша)

В совместных исследованиях ИБФМ РАН и ФМБА России установлено, что трео- D_s -изолимонная кислота (ИЛК) обладает мощным энергостимулирующим и антигипоксическим действием и может быть использована при длительных интенсивных физических нагрузках у спортсменов по циклическим видам спорта (легкая атлетика, плавание, лыжный спорт, конькобежный спорт, все виды гребли, велосипедный спорт и другие). За счёт стимуляции окислительно-восстановительных реакций, процессов дыхания и синтеза АТФ ИЛК активизирует физиологические функции органов и тканей, повышает физическую выносливость и работоспособность, стимулирует адаптационные и компенсаторно-защитные возможности организма, снимает хроническую усталость и напряжение после длительных физических нагрузок. Узким местом на пути широкого применения ИЛК в качестве препаратов для медицины и спорта является отсутствие её производства необходимого качества, природного изомерного состава и стоимости. Биологически активную ИЛК производят в небольших количествах из ежевики и сока специально-культивируемых растений *Sedum spectabile*.

Рядом зарубежных специалистов и авторами статьи проводится разработка биотехнологии получения ИЛК с использованием природных, мутантных и

рекомбинантных штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Совместно с «ГосНИИгенетика» сконструирован рекомбинантный штамм *Y. lipolytica* с суперэкспрессией мультикопийного гена аконитат-гидратазы *ACO1*, у которого происходил сдвиг равновесия изоцитрат-цитрат до соотношения 2,3:1, в то время как у исходного штамма дикого типа накопление ИЛК и лимонной кислоты (ЛК) было 1,1:1 [1]. В условиях периодического культивирования генно-инженерный штамм *Y. lipolytica ACO1* синтезировал свыше 70 г/л ИЛК. При изучении динамики синтеза ИЛК у *Y. lipolytica ACO1* в периодическом режиме было показано, что продуктивность культуры, максимальная в начале биосинтеза ИЛК, постепенно снижалась в ходе культивирования, и это делало нецелесообразным продолжение процесса дольше 5-6 суток. Указанный недостаток периодического режима определил необходимость поиска других способов культивирования, позволяющих продлить активный синтез ИЛК.

Одним из перспективных способов увеличения продолжительности биосинтеза лимонных кислот является культивирование с использованием режима отъемов-доливов [2]. Отъемно-доливной способ культивирования представляет собой процесс, при котором производится отъем культуральной жидкости через определенные промежутки времени, и в ферментер добавляется свежая питательная среда. Этот прием дает возможность постоянно обновлять клетки продуцента.

Целью настоящей работы было исследование способности рекомбинантного штамма *Y. lipolytica ACO1* к продолжительному, интенсивному и стабильному синтезу ИЛК с использованием режима отъемов-доливов.

Дрожжи культивировали в ферментере Biostat В Plus (Германия) объемом 5 л (с исходным объемом 2 л) на минеральной среде Ридер в условиях лимитирования роста клеток азотом. Автоматически поддерживали температуру (29⁰С), концентрацию растворенного в среде кислорода (50-60%), рН среды = 6 подтитровкой 30%-ным раствором КОН. В качестве источника углерода и энергии использовали рапсовое масло. Содержание кислот в культуральной жидкости определяли двумя независимыми методами (ВЭЖХ и энзиматический анализ с использованием диагностических наборов фирмы Boehringer Mannheim (Германия)).

При проведении экспериментов варьировали количеством доливаемой среды и количеством циклов. Были исследованы следующие варианты проведения ферментации методом отъемов-доливов: 1) отъем-долив 50%, 3 цикла; 2) отъем-долив 30%, 3 цикла; 3) отъем-долив 20%, 4 цикла. Процесс культивирования продуцента в режиме отъемов-доливов продолжали в течение 730 ч. На рис. 1 представлены результаты отъемно-доливного метода культивирования. Как видно из рисунка, даже на 730 ч концентрация ИЛК была высокой и составляла 105 г/л, содержание ЛК не превышало 35% от общего кислотообразования. При использовании режима отъем-долив 50% наблюдалась наиболее высокая производительность ферментера и выход ИЛК ($Y_{ИЛК}$) от потребленного рапсового масла, которые составили 0,4 г/л•ч и 64,2%, соответственно. При снижении количества доливаемой среды с 50% до 20% происходило снижение производительности ферментера и выхода продукта ($Y_{ИЛК}$) – на 6 и 17%, соответственно, что, возможно, было вызвано недостаточной степенью обновления культуры. Наибольший сдвиг равновесия в изоцитрат-цитрат до соотношения 2,4:1 наблюдался при использовании режима отъем-долив 50%.

Полученные результаты убедительно демонстрируют, что применение отъемно-доливного метода культивирования позволяет поддерживать активный синтез ИЛК, при этом рекомбинантный продуцент *Y. lipolytica ACO1* сохраняет биосинтетическую активность в течение длительного времени.

Часть исследований выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Московской области в рамках научного проекта № 14-48-03540 р_центр_а.

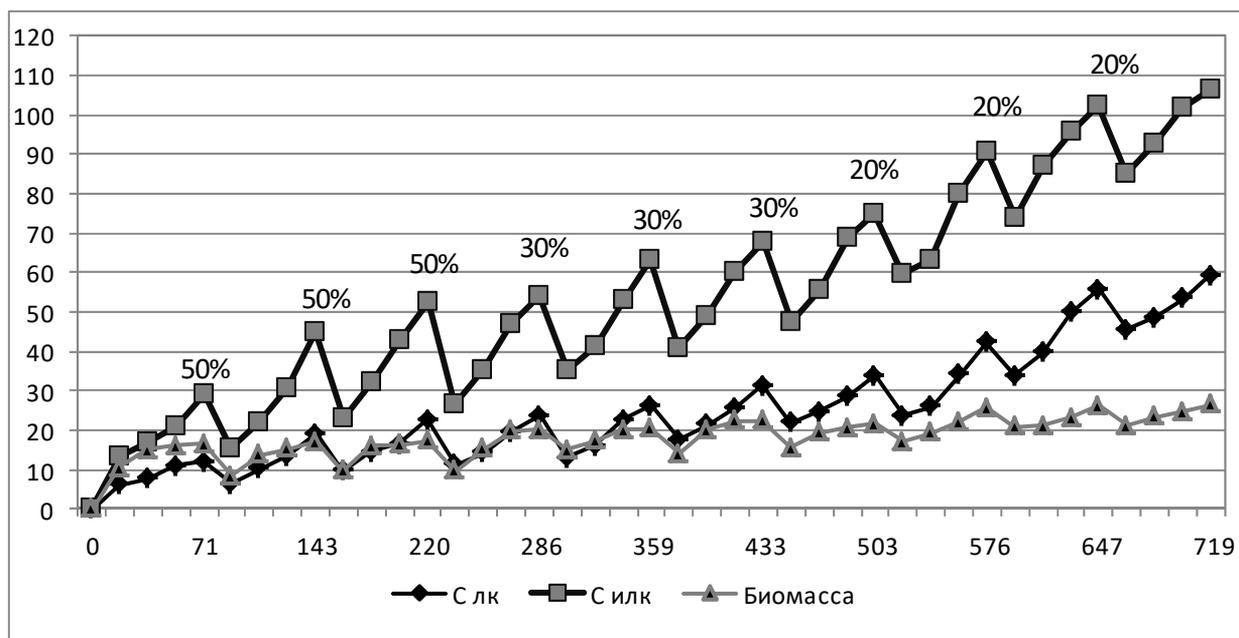


Рис. 1. Биосинтез ЛК у дрожжей *Y. lipolytica ACO1* в режиме отъемов-доливов

Список литературы

1. Лаптев И.А., Филимонова Н.А., Аллаяров Р.К., Камзолова С.В., Самойленко В.А., Синеокий С.П., Моргунов И.Г. // Биотехнология. - 2015. - № 6. – С.35-41.
2. Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Lunina J.N., Zelenkova N.F., Morgunov I.G. // Bioresource Technology – 2015. - V. 193. - P. 250-255.

Влияние температуры на рост, синтез липидов и арахидоновой кислоты грибами *Mortierella alpina* NRRL-A-10995

Миронов А.А.¹, Немашкалов В.А.²

¹Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

²Лаборатория биосинтеза ферментов ИБФМ РАН

Арахидоновая кислота (АК, 5, 8, 11, 14-цис-эйкозатетраеновая кислота) относится к омега-6 группе незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и играет важную роль в метаболических процессах в качестве предшественника простагландинов (серии 2), лейкотриенов и ряда эйкозаноидов. АК является действующим началом лекарственных средств и компонентов диетпитания, предотвращающих атеросклероз, коронарные болезни сердца и ряд других заболеваний. Подробная информация относительно применения АК в медицине и диетпитании приведена в обзорах [1, 2, 3]. Основными природными источниками арахидоновой кислоты являются печень и надпочечная железа животных, а также желток куриных яиц; но стоит отметить, что содержание АК в них настолько мало, что они не могут удовлетворить растущей потребности [4]. Таким образом, ограниченность природных источников АК диктует необходимость развития ее микробиологического производства. Наиболее перспективными продуцентами АК считаются грибы рода *Mortierella*. В настоящее время процессы получения АК с использованием различных *Mortierella* запатентованы в Европе, Китае, Японии.

Ранее в лаборатории физиологии микроорганизмов были селекционированы штаммы-продуценты *Mortierella alpina* LPM-301 и *M. alpina* NRRL-A-10995.

Нами было показано, что температура является мощным регулятором синтеза липидов и АК у *Mortierella alpina* LPM-301 [5].

Целью настоящей работы было изучение влияния температуры на рост, синтез липидов и АК штаммом *Mortierella alpina* NRRL-A-10995.

Грибы выращивали в условиях непрерывного культивирования в 2-л ферментере ферментационной установки КФ-108 (Россия) с рабочим объемом 750 мл. Минеральная питательная среда содержала в качестве субстрата азота и углеродного субстрата нитрат калия (1 г/л) и глицерин (6 %). Среду подавали в ферментер непрерывно со скоростью 5 мл/час; культуральную жидкость (120 мл) сливали, когда объем среды в ферментере достигал 750 мл. Скорость разбавления и, соответственно, удельная скорость роста в течение цикла между отъемами среды изменялась от 0,0079 до 0,0067 ч⁻¹. Культуру выращивали в периодическом режиме при температуре 24°C в течение 4 сут., затем включали проток среды вышеописанным способом и устанавливали исследуемые значения температуры (20, 22, 24, 28 ± 0.1°C). Достижение стационарного состояния роста определяли по установлению постоянной концентрации остаточного глицерина. Значения рН (6,0 ± 0.1) и рО₂ (10-50% от насыщения) поддерживали автоматически. Жирнокислотный состав липидов образцов биомассы определяли методом газожидкостной хроматографии.

Выявлено, что оптимальная температура культивирования для синтеза липидов и АК существенно различается (рис.1). Наибольшая концентрация АК наблюдалась при температуре 20°C и составляла 25,2 % от липидов. При повышении температуры наблюдалось резкое снижение АК и при 28°C ее доля не превышала 18,2 %. Наиболее благоприятной температурой для биосинтеза липидов являлась 28°C (22,2 % от биомассы), и понижение температуры привело к уменьшению общего содержания жирных кислот до 12,2 % при 20 °C. Таким образом, обнаружена обратная корреляция между синтезом липидов и АК у *M. alpina* NRRL-A-10995. Существенного влияния температуры на рост биомассы *M. alpina* NRRL-A-10995 не выявлено (рис 1).

Показанная обратная корреляция синтеза АК и липидов у штамма *M.alpina* NRRL-A-10995 совпадает с корреляцией, полученной при изучении влияния температуры на рост, синтез липидов и АК штаммом *M. alpina* LPM-301. Следовательно, можно сделать вывод, что выявленная закономерность является общей для грибов *M. alpina*.

Опираясь на полученные результаты, рекомендуется проведение двухстадийного культивирования для увеличения доли АК. На первой стадии, в период активного роста *M. alpina* NRRL-A-10995, устанавливается температура 28°C для активного синтеза липидов. На второй стадии температура снижается до 20°C для повышения содержания доли АК.

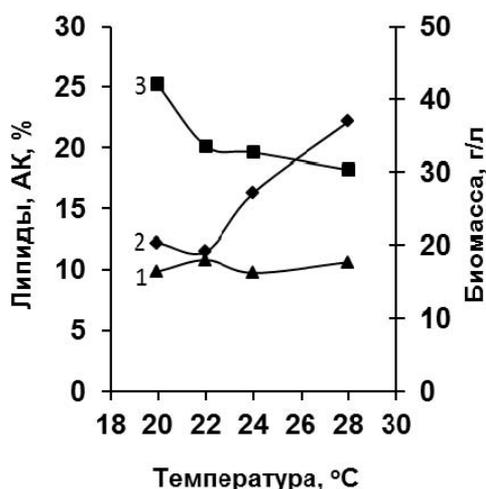


Рис. 1. Влияние температуры на рост (1), синтез липидов (2) и АК (3) у *M. alpina* NRRL-A-10995 в условиях непрерывного культивирования

Список литературы

5. Dyal S. D., Narine S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. // Food Res. Int. – 2005. – V. 38. – P. 445-467.
6. Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for cell single oil production. // Biochimie. – 2004. – V. 86. – P. 807-815.
7. Ward O., Singh A., Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. // Process Biochem. – 2005. – V. 40. – P. 3627-3652.
8. Zhu M., Yu L.J., Wu Y.X. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. // J. Ind. Microbiol Biotechnol. – 2003. – V. 30. – P. 75-79.
9. Дедюхина Э. Г., Чистякова Т. И., Миронов А. А., Камзолова С. В., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. Влияние pH, аэрации и температуры на синтез арахидоновой кислоты *Mortierella alpina* // Прикладная биохимия и микробиология, 2015, том 51, № 2, с. 1 – 7.

Исследование синтеза пальмитолеиновой кислоты у дрожжей

Степанова Н.Н.^{1,2}, Моргунов И.Г.^{1,2}

¹ Пуштинский государственный естественно-научный институт

² Лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН

Пальмитолеиновая кислота (ПОК) (цис-9-гексадеценвая кислота) относится к ω -7 группе мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК). ПОК является мощным антиоксидантом, проявляет антимикробную активность в отношении ряда патогенных бактерий и грибов, улучшает состояние кожи, волос и ногтей, защищает печень и другие внутренние органы от действия токсических веществ [1]. ПОК находит широкое применение в медицине, косметологии [2-3], пищевой и технической промышленности [4-5], а также рекомендована как перспективное средство для защиты растений от фитопатогенов в сельском хозяйстве [6].

ПОК получают из природных источников, таких как, облепиха, орехи макадамия, нутряной жир морских животных, жир норки. Однако, использование природного сырья ограничивает коммерческое получение ПОК. В последние годы рассматривается вопрос о перспективности микробиологического синтеза ПОК с использованием дрожжевых организмов [7].

Целью данной работы являлась селекция продуцентов ПОК среди различных дрожжевых культур и исследование динамики синтеза данного продукта у перспективных штаммов.

Объектами исследования были 17 штаммов дрожжей различной таксономической принадлежности: *Debaryomyces globosus* ВКМ Y-9539, *Trichosporon pullulans* ВКМ Y-2302, *Yarrowia lipolytica* 68, *Y. lipolytica* 69, *Y. lipolytica* 79, *Y. lipolytica* 86, *Y. lipolytica* 214, *Candida maltosa* ВКМ Y-293, *Y. lipolytica* ВКМ Y-57, *Diutina rugosa* ВКМ Y-67, *C. boidinii* ВКМ Y-2356, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2676, *Bl. adenivorans* ВКМ Y-2677, *Aciculoconidium aculeatum* ВКМ Y-1301, *Cryptococcus laurentii* ВКМ Y-1628, *Cr. albidus* ВКМ Y-1994, *Apiotrihum curvatum* АТСС-20509. Выбор глюкозы в качестве субстрата (источника углерода и энергии) обусловлен обеспечением образования продукта, который может применяться в пищевой и медицинской промышленности, а не только для технических целей.

Установлено, что в условиях лимитирования роста клеток азотом накопление биомассы у исследованных штаммов варьировало от 1,5 до 14,8 г/л, а содержание липидов в биомассе – от 3,6 до 37,4%. В составе липидов обнаружены ЖК с длиной цепи C₁₄–C₂₀ с преобладанием пальмитиновой, ПОК, олеиновой и линолевой кислот. Установлено, что штаммы дрожжей гетерогенны по способности к биосинтезу ПОК: 5 штаммов не

синтезировали ПОК, а у 12 штаммов доля ПОК в составе липидов варьировала от 2,2 до 33,5%. В результате селектированы штаммы *D. globosus* ВКМ У-9539 и *Y. lipolytica* 69, характеризующиеся повышенным синтезом ПОК — 304 и 315 мг/л, соответственно.

Исследование динамики роста, синтеза липидов и ПОК у штамма *D. globosus* ВКМ У-9539 показало, что биомасса достигала своего максимума (4,4 г/л) на 5-е сутки культивирования, наибольшее количество липидов в биомассе (20,0%) наблюдалось на 6-е сутки, доля ПОК в липидах колебалась в пределах от 28 до 33% (рис. 1а). Оптимальная продолжительность культивирования, обеспечивающая максимальный выход ПОК у штамма *D. globosus* ВКМ У-9539, составляет 6 суток (рис. 1б).

Таким образом, в результате скрининга различных видов дрожжевых культур отобраны штаммы с наибольшим содержанием ПОК: *D. globosus* ВКМ У-9539 и *Y. lipolytica* 69. Максимальное накопление липидов и ПОК у *D. globosus* ВКМ У-9539 было достигнуто на 6-е сутки культивирования.

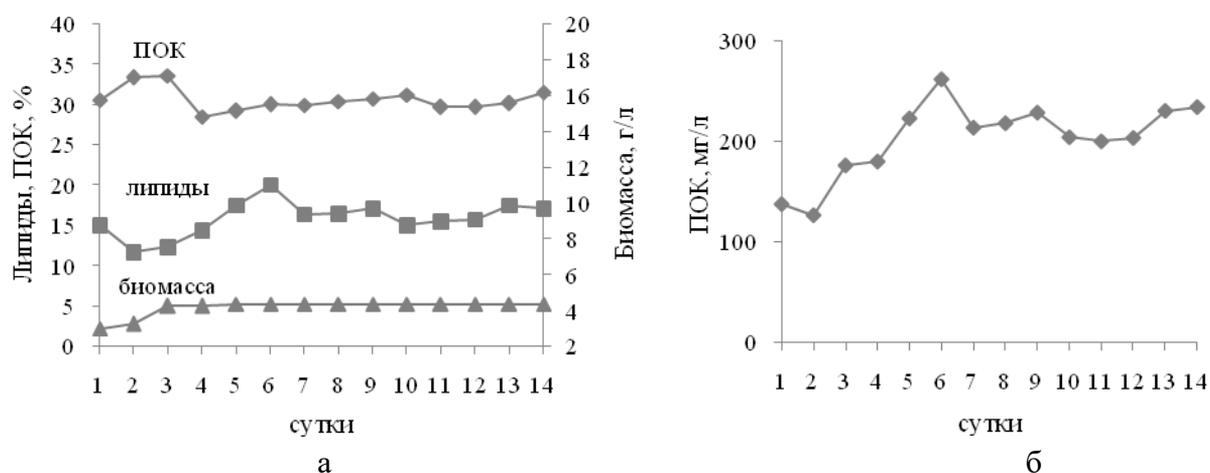


Рис. 1. Динамика роста, синтеза липидов и ПОК (а) и образование ПОК у штамма *D. globosus* ВКМ У-9539 (б)

Список литературы

1. Kunesova M. et al. // *Physiol. Res.* - 2006. - P. 63-72.
2. Griel A.E. et al. // *Journal of Nutrition.* - 2008. - № 138. - P. 761-767.
3. Welters H.J. et al. // *Apoptosis.* - 2006. - V. 11. - P. 1231-1238.
4. Knothe G., Krahl J., Gerpen J.V. // *Urbana: AOCS Press.* - 2010. - P.485-501.
5. Wu Y., Li R., Hildebrand D. F. // *Prog. Lipid Res.* - 2012. - V. 51. - P. 340-349.
6. Моргунов И.Г. и др. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* - 2016. - Т. 12. - № 3. - С. 41-52.
7. Kolouchová I. et al. // *Bioresource Technology.* - 2015. - №192. - P. 726-734.

Ответ клеток *Rhodococcus opacus* 1СР – деструктора бензоата – на стресс

Соляникова И.П.¹, Емельянова Е.В.³, Поливцева В.Н.², Сузина Н.Е.²

¹ Лаборатория энзиматической деградации органических соединений ИБФМ РАН

² Лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН

³ Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Бактериальный ответ на окислительный стресс в деталях изучен у *Escherichia coli* [1], *Acinetobacter oleivorans* DR1 [2], псевдомонад [3] и ряда других бактерий. Среди факторов, вызывающих окислительный стресс, авторы отмечают биодеградативную активность, образование биопленок, взаимодействие с растениями, наличие в окружающей среде тяжелых металлов и антибиотиков.

Целью данной работы было изучение влияния стрессов на клетки актинобактерии *Rhodococcus opacus* 1СР - деструктора ароматических соединений: на их выживаемость, биодеградативную и метаболическую активность.

Исследована способность актинобактерии *Rhodococcus opacus* 1СР переживать неблагоприятные условия и сохранять биодеградативную активность. Хранение клеток *R. opacus* 1СР в виде суспензии в буфере при 4°C приводило к равномерному снижению дыхания клеток по мере их голодания до 25% за 7 суток. Старение культуры сопровождалось постепенным падением активности бензоат 1,2-диоксигеназы (БДО). Через 14 месяцев хранения суспензии клеток, выращенных на бензоате, скорость реакции БДО составляла 21 рА/с, дыхание сохранялось на низком, но стабильно воспроизводимом уровне. Хранение клеток при более высокой температуре, 25°C, приводило к полному падению активности БДО. Показана обратимость потери БДО активности. Добавление бензоата (300 мг/л) к клеткам, которые хранили при 25°C в течение 4 мес. и в которых не определялась активность БДО, приводило к повышению их дыхательной активности. Процесс сопровождался индукцией БДО: активность возрастала в 40 раз в течение первых суток после добавления ростового субстрата.

Проведено сравнительное изучение морфологических и ультраструктурных особенностей клеток *R. opacus* 1СР, разлагающих бензоат, в присутствии окислителей и стрессо-протекторов. Изучено поведение культуры *R. opacus* 1СР при росте на бензоате в присутствии H₂O₂, юглона, менадиона, кверцетина. Бактерицидный и бактериостатический эффекты зависели от концентрации окислителей. Лаг-период для клеток, инокулированных в жидкую среду со 100 мг/л бензоата, составил 8 часов (при инокуляции ОП₅₄₅ ~ 0.1). В таких условиях одновременное внесение бензоата и H₂O₂ в диапазоне концентраций 50-200 мМ полностью подавляло рост клеток.

Внесение потенциальных ингибиторов и протекторов через 24 ч от посева клеток, когда культура находилась в начале логарифмической фазы роста, позволило дифференцировать действие добавляемых соединений. Клетки культуры, выращенные на бензоате до ОП₅₄₅ 0.6-0.8 (суммарное потребление субстрата – 300 мг/л), проявляли повышенную устойчивость к стрессовому воздействию H₂O₂ – полное ингибирование роста культуры было получено при добавлении H₂O₂ в концентрации 200 мМ.

Через два часа после воздействия стрессора наблюдалось изменение жирнокислотного состава клеток, повышалась активность антиокислительных ферментов, происходили морфологические и ультраструктурные изменения клеток.

Исследование ультратонкого строения клеток, выращенных на бензоате, показало, что особенностью этих клеток являлось присутствие в цитоплазме множественных электронно-прозрачных включений полигидроксиалканоатов (ПГА) и появлением

единичных электронно-плотных включений полифосфатов (ПФ). Популяция клеток *R. oracis* 1CP в условиях роста на бензоате в присутствии H₂O₂ в концентрациях 50 мМ и 100 мМ характеризовалась меньшими размерами, по сравнению с ростом в отсутствие перекиси, как отдельных клеток, так и клеток в конгломератах. В ней преобладали клетки в форме коротких палочек или овоидов, часто с высокой степенью рефрактерности. При росте на бензоате в присутствии H₂O₂ в концентрации 100 мМ в культуре появлялись лизированные клетки в виде пустых оболочек (теней).

R. oracis 1CP не рос на кверцетине в качестве ростового субстрата. Кверцетин оказывал протекторное действие на клетки *R. oracis* 1CP при разложении бензоата. Ряд авторов высказывает сомнения в наличии положительного влияния кверцетина на организмы эукариот и прокариот [4-6]. Например, показано антимикробное действие кверцетина, основанное на ингибировании активности бактериальной гиразы, отвечающей за суперспирализацию ДНК, на индукции расщепления ДНК и на ингибировании функций цитоплазматической мембраны [4-6]. Полученные нами предварительные результаты показывают, что в проведенных исследованиях это соединение вело себя как протектор. Это выражалось в изменениях, происходящих с клетками на ультратонком уровне при полном отсутствии ингибирования скорости разложения бензоата. Культивирование клеток на бензоате в присутствии кверцетина не приводило к значительным отклонениям от кривой роста на одном бензоате. Однако, цитоплазма клеток, выращенных на бензоате в присутствии кверцетина, содержала единичные мелкие электронно-прозрачные включения полиалканоатов и мелкие электронно-плотные включения ПФ. Таким образом, в присутствии кверцетина морфология клеток была сходна с их состоянием в отсутствие окисляющих агентов. А добавление кверцетина к клеткам, культивируемым с бензоатом в присутствии 100 мМ H₂O₂, приводило к более быстрому возобновлению роста по сравнению с вариантом, в котором кверцетин отсутствовал.

Сформулирована стратегия выживания культуры в неблагоприятных условиях - уменьшение размеров/объемов клеток и образование плотноупакованных клеточных конгломератов, в которых клетки объединены общим матриксом. Формирование конгломератов, по-видимому, можно рассматривать как коллективный способ защиты клеток от агрессивных факторов внешней среды: многоклеточная структура конгломерата и вещество матрикса затрудняют проникновение токсичных веществ внутрь конгломератов, способствуя выживанию расположенных внутри клеток. Перечисленные структурные и морфологические изменения (уменьшение размеров, округление клеток, формирование многоклеточных конгломератов) являются признаками перехода клеток в покоящееся состояние. Возможно, в ответ на окислительный стресс клетки «включают» механизм структурных перестроек перехода в покой, не «выключая» при этом метаболическую активность. Такая стратегия, вероятно, позволяет предохранить активно метаболизирующие клетки от повреждающих агрессивных факторов среды.

Работа частично поддержана грантом РФФИ-Белоруссия №14-04-90045.

Список литературы

1. Farr, S.B. and Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, 55, 561–585.
2. Kim, J., Cho, Y., Jang, I.-A., and Park, W. (2015) Molecular mechanism involved in the response to hydrogen peroxide stress in *Acinetobacter oleivorans* DR1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99 (24), 10611-10626. DOI 10.1007/s00253-015-6914-5.
3. Kim, J. and Park, W. (2014) Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 6933–6946. DOI 10.1007/s00253-014-5883-4.
4. Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., and Jerala, R. (2003) Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306 (2), 530–536. doi:10.1016/S0006-291X(03)01006-4

5. Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 26, 343–356.
6. Fetzner, S. (2012) Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold, *Appl. Environm. Microbiol.*, 78 (8), 2505–2514. doi:10.1128/AEM.07651-11

Ксиланазы бактерии *Cellulomonas flavigena*: экспрессия, биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал

**Лисов А.В.¹, Белова О.В.¹, Лисова З.А.¹, Винокурова Н.Г.¹, Нагель А.С.²,
Андреева-Ковалевская Ж.И.², Бударина Ж.И.², Нагорных М.О.²,
Захарова М.В.², Шадрин А.М.², Солонин А.С.², Леонтьевский А.А.¹**

¹ Лаборатория микробной энзимологии ИБФМ РАН

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Были клонированы гены четырёх ксиланаз бактерии *Cellulomonas flavigena*. Анализ последовательностей генов показал, что были получены клоны трёх ксиланаз, принадлежащих к семейству глюкогидролаз GH10 (ксиланазы были названы нами CFXu11, CFXu12 и CFXu14), и одной ксиланазы, принадлежащей к семейству GH11 (CFXu13). Ферменты были экспрессированы в *Escherichia coli* и получены в электрофоретически гомогенном состоянии. Были исследованы физико-химические свойства ксиланаз. Ксиланазы обладали умеренной термостабильностью и нейтральным оптимумом pH. Все четыре ксиланазы были более стабильны в щелочной области pH. Основными продуктами гидролиза ксилана ксиланазы CFXu11 и CFXu12 были ксилобиоза, ксилотриоза, ксилогексаоза, ксилопентаоза и ксилоза. Такой набор продуктов гидролиза ксилана является типичным для ксиланаз семейства GH10. Ксиланазы CFXu13 и CFXu14 гидролизовали ксилан до таких же продуктов, но ксилоза образовывалась в очень маленьком количестве. Образование очень небольшого количества ксилозы ксиланазой CFXu14 является необычным, поскольку для ксиланаз семейства GH10 характерно образование большого количества ксилозы. Все ксиланазы эффективно осахаривали рожь, пшеницу и овёс, которые являются обычными компонентами кормов животных, что указывает на высокий потенциал применения исследованных ксиланаз в сельском хозяйстве.

Частичная характеристика бактериальной сериновой протеиназы семейства S1A из *Streptomyces avermitilis*

Афошин А.С.¹, Шадрин А.М.², Лисов А.В.¹, Леонтьевский А.А.¹

¹ Лаборатория микробной энзимологии ИБФМ РАН

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

Бактериальные протеиназы – это ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей в белках и пептидах. Исследования бактериальных протеиназ как промышленных ферментов обуславливается тем, что большая часть кормовых ферментов и ферментов для бытовой химии поставляются иностранными производителями. Создание отечественных конкурентоспособных ферментных препаратов представляется актуальность задачей и

согласуется с «Комплексной программой по развитию биотехнологии в России на период до 2020 года».

В качестве источника генетического материала, кодирующего ранее неохарактеризованную протеиназу семейства S1A, был выбран штамм *Streptomyces avermitilis* - ВКМ Ас-1301, относящийся к порядку *Actinomycetales*.

В данной работе мы представляем результаты частичной характеристики очищенной рекомбинантной сериновой протеиназы семейства S1A, ген которой был экспрессирован в штамме *E.coli* M15 (pREP4).

Проведено изучение влияния температуры, pH среды, детергентов (SDS, Triton X-100, Twin 20) на активность сериновой протеиназы при гидролизе казеина и гемоглобина. Установлено значение температурного оптимума действия сериновой протеиназы - 60 °С. Определен оптимум pH - 8 (при гидролизе 2% денатурированного гемоглобина) и 10÷11 (при гидролизе 2% казеина). Показано, что активность сериновой протеиназы не ингибируется полностью в присутствии 5% SDS и незначительно изменяется в присутствии 5% Triton X-100 и 5% Twin 20.

Полученные результаты являются предпосылкой, для возможного применения данной протеиназы в составе моющих средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере - (договор №5843 ГУ 2015 от 10.06.2015).

Структурно–функциональные особенности литических Протеаз Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1

***Кудрякова И.В.¹, Тищенко С.В.², Габдулхаков А.Г.², Цфасман И.М.¹,
Лысанская В.Я.¹, Васильева Н.В.¹***

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

²ФГБУН Институт белка РАН

Внеклеточные литические протеазы Л1 (AlpA) и Л5 (AlpB) грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1 являются наиболее активными антимикробными компонентами препарата лизоамидаза, гидролизующего клеточные стенки патогенных микроорганизмов, в т.ч. множественно-устойчивых форм. Л1 и Л5 гомологичны друг другу (61,5%) и хорошо изученной α -литической протеазе *Lysobacter enzymogenes* (78 и 56% соответственно) [1-3]. Несмотря на гомологию, ферменты имеют отличия в своем функционировании. Так, ранее было показано, что протеолитическая активность белка Л5 на казеине выше, чем белка Л1. Для белка Л1 показано, что в пептидогликане стафилококка он гидролизует пептидные связи в межпептидном мостике и амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и первой аминокислотой пептидной субъединицы. Установлены различия в путях секреции этих белков: белок Л1, вероятно, использует секреторную систему второго типа (T2SS), а белок Л5 секретируется посредством внешнемембранных везикул, образуемых клетками *Lysobacter* sp. XL1. Задачами данной работы было установить специфичность действия белка Л5 и изучить структурные особенности белков Л1 и Л5. Следует отметить, что структурные исследования для подобных белков проведены только для α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes* [1].

Специфичность действия белка Л5 определяли на пептидогликане *Staphylococcus aureus* 209Р. Методом динитрофенилирования Гюзена и Строминджера было

установлено, что N-концевые участки аланина и глицина становятся доступными для 2,4-динитрофторбензола после реакции белка Л5 с пептидогликаном. Это свидетельствует о гидролизе белком Л5 пептидных связей в межпептидном мостике (глицин-глицин), а также связи с высвобождением N-аланина (эндопептидазная и амидазная активности соответственно). Амидазная активность белка Л5 была подтверждена на флюорогенном синтетическом субстрате Abz-Ala-Ala-Phe-pNa, в котором белок расщеплял связь между фенилаланином и п-нитроанилином. Таким образом, специфичность действия белка Л5 в отношении пептидогликана стафилококка совпадает с белком Л1. Однако отмечено, что интенсивность гидролиза пептидогликана ферментом Л5 значительно ниже.

Для структурных исследований были получены кристаллы белков Л1 и Л5 и собраны рентгенодифракционные данные. Структуры определены с разрешением 1,35 Å и 1,6 Å для Л1 и Л5 белка соответственно. При исследовании кристаллов белка Л5 в ассиметричной части ячейки было обнаружено две молекулы белка с большим количеством контактов на мономер-мономер интерфейсе. Это вызвало предположение о димеризации белка. Методами эксклюзионной хроматографии и нативным электрофорезом в катодной системе Рейсфельда было доказано, что белок Л5 является мономером. Наложение структур белков Л1 и Л5 на структуру α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes* (pdb - 2ALP) показало совпадение. Однако имеются и существенные различия. Особое внимание обращают на себя две петли в белке Л5. Петля 1, помимо неидентичного аминокислотного состава, отличается от эквивалентных петель гомологов также по длине. Петля 2 имеет разрыв в области от 171 а.о. до 183 а.о., который обусловлен высокой ее подвижностью. В результате фрагмент петли не удалось зафиксировать в электронной плотности. Эквивалентные петли Л1 и α -литической протеазы являются более стабильными. Выявленные домены белка Л5 могут быть функционально значимыми. В частности, для понимания в будущем особенностей путей секреции этих белков.

Также были проведены начальные эксперименты для понимания функционирования активных центров литических белков Л1 и Л5. С одной стороны известно, что сериновые протеазы бактерий имеют большую субстратную специфичность в отличие от сериновых протеаз млекопитающих, что связано с более пластичным активным центром первых [4]. С другой стороны, для хорошо изученной α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes*, гомологичной белкам Л1 и Л5, показана только эндопептидазная активность (UniProtKB - P00778), в то время как для первых установлена еще и амидазная активность на пептидогликане *S. aureus* 209P. Для попытки понять, почему у таких высоко гомологичных белков наблюдаются отличия в специфичности действия, были проведены эксперименты по сокристаллизации белка Л1 с ингибитором сериновых протеаз 4-(2-аминоэтил) бензеносульфонилофторид (АЕBSF). Рентгеноструктурный анализ выявил, что часть молекул АЕBSF связываются с Ser (Ser195) активного центра белка Л1 по стандартному механизму: O(Ser195)-S(AEBSF), что приводит к необратимому ингибированию белка. Другая часть молекул АЕBSF взаимодействует с Ser195 посредством водородной связи HO(Ser195)-O(AEBSF). Последняя связь является непрочной, поэтому можно предположить, что часть молекул АЕBSF взаимодействуют с Ser195 обратимо. Были проведены биохимические реакции между комплексом белок Л1 - ингибитор АЕBSF и субстратом во времени. Было выявлено, что за 24 ч происходит восстановление активности фермента до 17%. При предварительной промывке комплекса 10 мМ Трис – HCl (pH 8,0), содержащим 50мМ NaCl, до реакции с субстратом значение восстановления активности возросло до 28%. В то время как восстановление активности трипсина в тех же условиях не происходило. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что часть молекул белка Л1

действительно взаимодействуют с АЕBSF нестандартным способом - обратимо. Такой тип взаимодействия между ингибитором группы сульфонилов и сериновыми протеазами показан впервые. Методом ЯМР-спектроскопии комплекса α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes* и ингибитора из группы сульфонилов - фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) получены результаты, доказывающие стандартный тип ингибирования [5]. Можно предположить, что фермент Л1 может иметь более пластичный активный центр, чем α -литическая протеаза, что объясняет его амидазную активность в отношении пептидогликана. Дальнейшие эксперименты будут направлены на изучение этого.

Результаты проведенной работы будут способствовать дальнейшему, более глубокому пониманию функционирования литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Авторы выражают благодарность лаборатории энзимологии генетических процессов ИБФМ РАН (рук. к.б.н. Грановский И.Э.) за предоставленный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3); к.б.н. Винокуровой Н.В. за консультации в проведении тонкослойной хроматографии и к.б.н. Мачулину А.В. за консультацию и обсуждение ряда полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки RFMEFI60714X0013 (соглашение № 14.607.21.0013).

Публикация по результатам работы:

Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Melnik B., Kudryakova I., Latypov O., Vasilyeva N., Leontievsky A. Structural Studies of Component of Lysoamidase Bacteriolytic Complex from *Lysobacter* sp. XL1 // Protein J. – 2016. – V.35. – №1. – p.44 – 50.

Список литературы

1. Fuhrmann C.N., Kelch B.A., Ota N., Agard D.A. The 0.83 Å resolution crystal structure of alpha-lytic protease reveals the detailed structure of the active site and identifies a source of conformational strain // J Mol Biol. – 2004. – V.338. – p.999 – 1013.
2. Mace J.E., Wilk B.J., Agard D.A. Functional linkage between the active site of alpha-lytic protease and distant regions of structure: scanning alanine mutagenesis of a surface loop affects activity and substrate specificity // J Mol Biol. – 1995. – V.251. – p.116 – 134.
3. Bone R., Shenvi A.B., Kettner C.A., Agard D.A. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid // Biochemistry. – 1987. – Vol.26. – p.7609– 7614.
4. Perona J.J., Craik C.S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold // J Biol Chem. – 1997. – V.272. – p.29987– 29990.
5. Bachovchin W.W. 15N NMR spectroscopy of hydrogen-bonding interactions in the active site of serine proteases: evidence for a moving histidine mechanism // Biochemistry. – 1986. – Vol.25. – p.7751– 7759.

Изучение литического потенциала *Lysobacter capsici* ВКМВ-2533

Протас К.Г., Кудрякова И.В., Васильева Н.В.

Лаборатория биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН

Одной из главных проблем медицинской микробиологии является появление антибиотико-резистентных штаммов микроорганизмов. Формирование новых механизмов резистентности у бактерий приводит к тому, что они становятся нечувствительны к известным на сегодняшний день антибиотикам. Серьёзной проблемой является и развитие

фунгицидо-резистентности. Широкое внедрение в практику системных фунгицидов привело к появлению резистентных грибных возбудителей.

Род *Lysobacter* известен продукцией ряда антибиотиков, литических ферментов и коротких пептидов, обладающих антифунгальной и антимикробной активностью [1]. Причем многие из биологически активных соединений, продуцируемых *Lysobacter* spp., ещё не исследованы. В связи с этим поиск и выделение литических агентов рода *Lysobacter* является перспективным направлением микробиологии и медицины.

Данная работа является началом изучения литического потенциала *L. capsici* ВКМВ-2533. Установлено, что этот штамм продуцирует в культуральную жидкость биологически активные соединения. Литическое действие препарата культуральной жидкости *L. capsici* было исследовано методом спот-теста на живых условно-патогенных штаммах грамположительных, грамотрицательных бактерий и мицелиарных грибах. Литический эффект был обнаружен по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium flavum* и *Bacillus cereus* и грибам *Fusarium sporotrichiella*, *Fusarium solani* и *Sclerotinia sclerotiorum*.

Комплекс микробиологических и биохимических экспериментов позволили выявить оптимальную питательную среду и оптимальные условия для культивирования *L. capsici* и продукции литических агентов. Для выявления вероятных агентов белковой природы проведён сравнительный электрофоретический анализ белков культуральной жидкости. Установлено, что с увеличением времени культивирования в культуральной жидкости появляется ряд белков с молекулярной массой преимущественно до 40 кДа, что сопряжено с повышением литической активности. Возможно, это связано с присутствием бактериолитических ферментов.

Для выделения литических белков на первом этапе было проведено фракционирование культуральной жидкости *L. capsici* посредством осаждения белков сульфатом аммония. В результате получено четыре фракции, осажденные сульфатом аммония в градиенте насыщения 0-20, 20-40, 40-60 и 60-80%. Все фракции проявили литическую активность по отношению к автоклавированным клеткам *S. aureus* 209Р. При этом наибольшей литической активностью обладали агенты, осаждаемые при концентрации сульфата аммония от 60 до 80%. Эта фракция также обладала наибольшей активностью в отношении грибов *Fusarium sporotrichiella* и *Fusarium solani*.

Дальнейшие исследования будут направлены на разработку методов выделения этих агентов.

Список литературы

1. Xiea Y., Wrighta S., Shenb Y. Bioactive natural products from *Lysobacter* // Nat Prod Rep. – 2012. – V.29(11). – p. 1277–1287.

Создание рекомбинантных микобактерий, продуцирующих тестостерон

**Карнов М.В., Суходольская Г.В., Николаева В.М., Фокина В.В.,
Шутов А.А., Донова М.В., Стрижов Н.И.**

Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

Тестостерон (андрост-4-ен-17 β -ин-3-он) является основным мужским половым гормоном, анаболическим стероидом, а также лекарством и предшественником других важных стероидных лекарственных средств. Обычно его получают путем химического

синтеза. Полно-клеточный микробный биокатализ для производства тестостерона путем отщепления боковой цепи стероидов (например, дешевые и доступные фитостерины, или холестерин) все еще находится в начальной стадии развития. Ранее, использование штамма *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1816D, продуцента андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД), позволило нам получить тестостерон из β -ситостерина за одну биотехнологическую операцию [1]. Однако, уровень биоконверсии (β -ситостерин в тестостерон) не превышал 50% даже при низких нагрузках.

Для дальнейшего улучшения процесса гетерологические 17β -гидроксистероид-дегидрогеназы/ редуктазы (17β -ГСД), катализирующие ключевую реакцию восстановления андрост-4-ен-3,17-диона (АД) в тестостерон (рис. 1) были введены в клетки микобактерий. ДНК последовательности, кодирующие три различные 17β -ГСД (грибная *Cochliobolus lunatus*, человеческая - 17β -ГСД 3-го типа, мышьяная - 17β -ГСД 5-го типа) были созданы *in silico*.

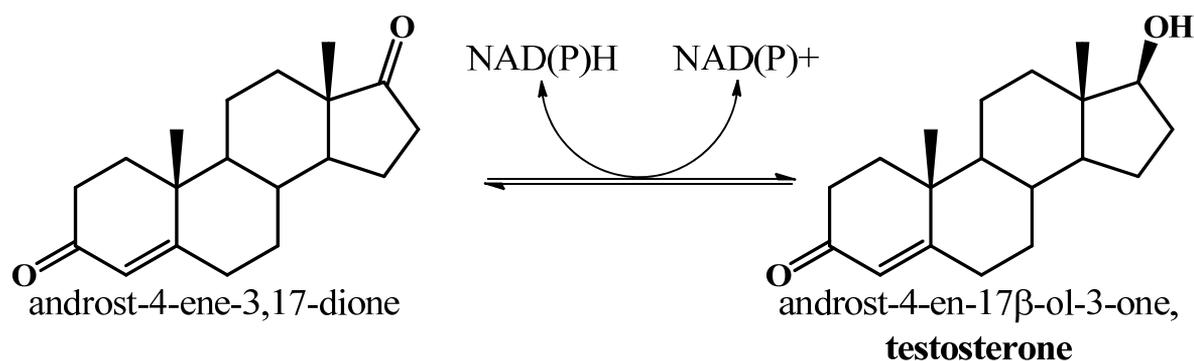


Рис. 1. 17β гидрирование андрост-4-ен-3, 17-диона (АД) в тестостерон с использованием 17β -гидроксистероиддегидрогеназ/редуктаз (17β -ГСД). НАД(Ф)Н используется в качестве кофермента

В качестве основы кДНК и соответствующие белковые последовательности были взяты из базы данных GenBank NCBI: ACCESSION AF069518, *Cochliobolus lunatus* 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17β -ГСДCl); ACCESSION NP_000188, *Homo sapiens* testosterone 17-beta-dehydrogenase 3 (17β -ГСДHs); ACCESSION P70694, *Mus musculus* Estradiol 17-beta-dehydrogenase 5 (17β -ГСДMm).

кДНК последовательности гриба, человека и мыши были перекодированы и оптимизированы (спектр использования кодонов, вторичные структуры РНК; все редко используемые кодоны и внутригенные Шайн-Дальгарно последовательности были устранены) для высокой экспрессии в клетках микобактерий. ГЦ содержание было увеличено до 62,6% (гриб), 58,1% (человек), 59,0% (мышь) по сравнению с 57,4%, 47,5%, 43,8% соответственно, в нативных последовательностях.

С целью смещения окислительно-восстановительного потенциала в клетках в сторону восстановления для проведения реакции гидрирования (в нашем случае гидрирование АД в тестостерон) гены, кодирующие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (6ФГД) были также введены в микобактерии для контролируемой экспрессии этих дегидрогеназ, генерирующих донор водорода НАД(Ф)Н. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv служил в качестве источника генов G6PD (Rv1121, zwf1; Rv1447c, zwf2) и 6PGD (Rv1122, gnd2).

Предварительный экспрессионный и функциональный анализ, проведенный в *Escherichia coli* бактериях показал, что сконструированные рекомбинантные плазмиды (на основе вектора pET28) обеспечивали высокий уровень экспрессии гетерологических

белков, а продуцированные гетерологические 17β -оксостероидредуктазы способны восстанавливать АД в тестостерон *in vitro*.

Были созданы два комплекта микобактериальных конструкций: бицистронный с двумя скомбинированными генами (17β -ГСД и Г6ФД) и моноцистронный, в которых эти гены были помещены под контроль индуцируемого ацетамидазного промотора. С использованием этих конструкций были получены рекомбинантные штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc²155, экспрессирующие гетерологические 17β -ГСД (грибная 17β -ГСДС1, человеческая 17β -ГСДНs, мышьяная 17β -ГСДМm). Созданные микобактерии восстанавливали АД в тестостерон. Наиболее высокий уровень биосинтеза тестостерона достигал 0,53 г/л при 1,0 г/л АД нагрузке (53% конверсии) в случае грибной 17β -ГСДС1, коэкспрессированной с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой Г6ФДMt2 из *M. tuberculosis*. При использовании АДД в качестве субстрата биоконверсии рекомбинантные микобактерии продуцировали тестостерон и болденон (андроста-1,4-диен- 17β -ин-3-он) (рис. 2). Полная конверсия АДД в эти продукты была достигнута с использованием бицистронной конструкции, кодирующей 17β -ГСДС1 и Г6ФДMt2.

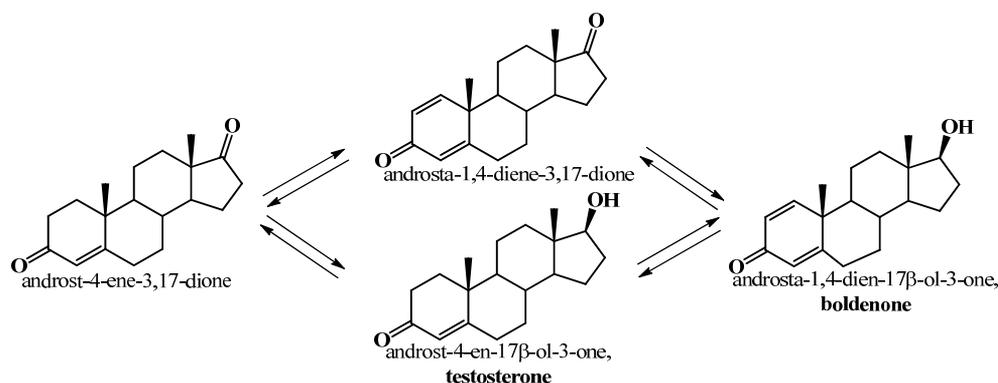


Рис. 2. Взаимопревращения АД (андростан-4-ен-3,17-дион), АДД (андроста-1,4-диен-3,17-дион), болденона (андроста-1,4-диен- 17β -ин 3-он) и тестостерона (андрост-4-ен- 17β -ин-3-он) посредством 17β - и 1-окисления/восстановления

Значительное количество тестостерона может быть получено в клетках *M. smegmatis* mc²155 из обоих субстратов АД и АДД с использованием собственного потенциала для 17β - и 1-гидрирования (рис. 2), т.е. без гетерологических 17β -ГСД, при условии обеспечения необходимого количества восстановленного НАД(Ф)Н (конструкции, кодирующие только Г6ФДMt1, 2 и 6ФГДMt).

Рекомбинантный *Mycobacterium neoaurum* VKM Ac-1816D штамм с плазмидой pNS25, кодирующей грибную 17β -ГСДС1 и Г6ФДMt2 эффективно конвертировал β -ситостерин в тестостерон и существенно превосходил исходный нерекомбинантный VKM Ac-1816D (обычно используемый в качестве продуцента АДД) как по выходу продукта (4,1 г/л и 5,9 г/л тестостерона при нагрузке 10 г/л и 20 г/л β -ситостерина, соответственно), так и по полноте биоконверсии и уровню побочных продуктов биокатализа.

Созданные рекомбинантные штаммы могут быть использованы в качестве платформы для эффективного одностадийного биотехнологического процесса биосинтеза тестостерона из фитостерина.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 14-24-00169.

Список литературы

- [1]. Egorova, O. V.; Nikolayeva, V. M.; Sukhodolskaya, G. V.; Donova, M. V. J. Mol. Catal. B: Enzym 2009, 57, 198–203.

Биотрансформация станолов микобактериями

Довбня Д.В.¹, Барабошкина Т.Г.^{1,2}, Донова М.В.¹

¹ Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

² Пушчинский государственный естественно-научный институт

Фитостерин (Ф) – это смесь растительных стерина в естественных пропорциях, получаемая из отходов первичной переработки растительного сырья - масличных сельскохозяйственных культур или древесины. По химической структуре растительные стерины аналогичны холестерину, который является предшественником стероидных гормонов млекопитающих и человека. Ф служит сырьем для промышленного получения стероидных фармацевтических субстанций. Важный этап их производства – биотрансформация Ф в один из ключевых стероидных полупродуктов, таких как андрост-4-ен-3,17-дион (АД), [1].

Стериновый состав Ф определяется его растительным источником, при этом для биотехнологических целей выделение индивидуальных стерина из смеси экономически нецелесообразно. Помимо стерина как первичное сырье, так и Ф может содержать значительную примесь 5(6)-насыщенных аналогов стерина – станолов, преимущественно ситостанола (3 β ,5 α -стигмастан-3-ола) и кампестанола (3 β ,5 α -эргостан-3-ола) [2, 3].

В настоящее время актуальна замена Ф соевого происхождения на более доступный Ф, происходящий из отходов целлюлозно-бумажной промышленности (таллового пека). Последнее особенно важно для организации перспективных производств стероидных субстанций на территории РФ из отечественного сырья. Коммерческие образцы таллового Ф могут содержать до 30% (в среднем 10 – 15%) станолов. В доступной литературе нет сведений о биоконверсии станолов в ключевые стероидные полупродукты.

Целью данного исследования было изучение возможности и особенностей полного окисления и биотрансформации станолов микобактериями.

В работе использовали следующие культуры микобактерий: *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, способную к полному окислению стерина [4] и *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D, конвертирующую фитостерин в АД [5] (Рис. 1). В качестве модельных субстратов использовали холестерин (5-холестен-3 β -ол, Serva, Германия), холестанол (5-холестан-3 β -ол, Sigma-Aldrich, США), талловый Ф, содержащий 79,2% β -ситостерина и 10% ситостанола (Phyto-S-sterol, S&D Chemicals, Англия) и ситостанол (обогащенную ситостанолом смесь Special Stanol Blend, R, AS-5). Субстраты вносили в количестве 15 ммоль/л. Для анализа стерина, станолов и стероидов использовали методы ВЭЖХ, ГЖХ и ТСХ.

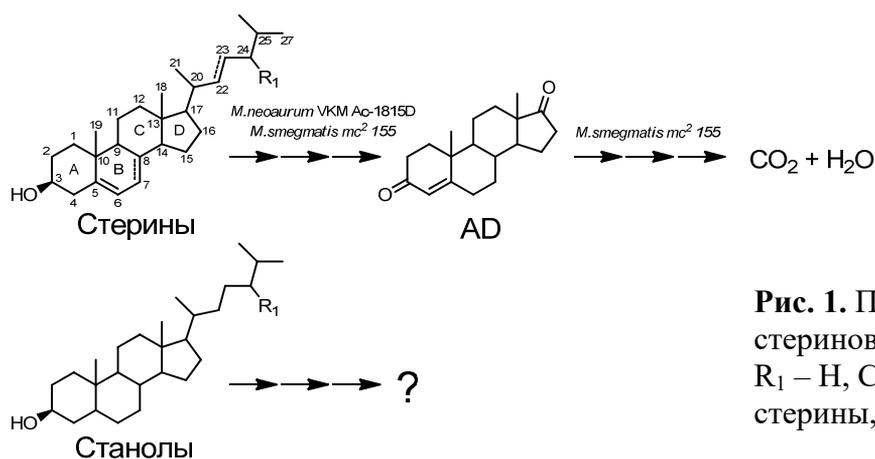


Рис. 1. Превращение стерина микобактериями. R₁ – H, CH₂, C₂H₅ (различные стерина, станола)

Было показано, что характер окисления холестерина и холестанола растущими бактериями *M. smegmatis* мс² 155 идентичен в пределах погрешности измерений (Рис. 2А). Введение в среду биотрансформации статистически метилированного β-циклодекстрина (МЦД), обладающего солюбилизирующими и пермеабилзирующими свойствами, приводило к полной утилизации обоих субстратов за 48 часов инкубации (Рис. 2Б).

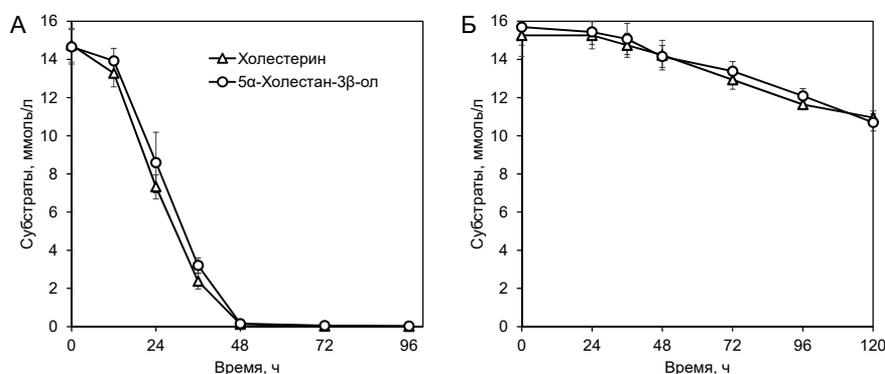


Рис. 2. Окисление холестерина и холестанола бактериями *M. smegmatis* мс² 155. А – в присутствии МЦД; Б – без солюбилизатора

Культура *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D конвертировала холестанол и ситостанол в АД и ряд минорных стероидных продуктов с 3-кето-4-ен- конфигурацией. Качественный состав продуктов при биотрансформации станолов и контрольных субстратов не различался.

В присутствии МЦД превращение всех субстратов было полным и заканчивалось в течение ~72 часов, при этом суммарный мольный выход 3-кето-4-ен- стероидов составлял 96 – 100% (Рис. 3А). Выход АД в биотрансформации холестанола и холестерина был идентичен и составлял 71 – 72% (~3,1 г/л).

Вместе с тем, в отсутствие МЦД, эффективность биотрансформации насыщенных и ненасыщенных субстратов заметно различалась. Выход 3-кето-4-ен- продуктов из холестанола был в ~1,3 раза выше, чем из холестерина. Эффективность биотрансформации ситостанола была, напротив, в 3,3 раза ниже в сравнении с фитостерином (Рис. 3Б). Возможно, эти различия обусловлены физико-химическими, а не биохимическими факторами.

Таким образом, в прямых экспериментах установлена принципиальная возможность полного окисления и биотрансформации станолов в АД микобактериями. Полученные результаты обосновывают возможность эффективного использования таллового Ф в производстве стероидных фармацевтических субстанций.

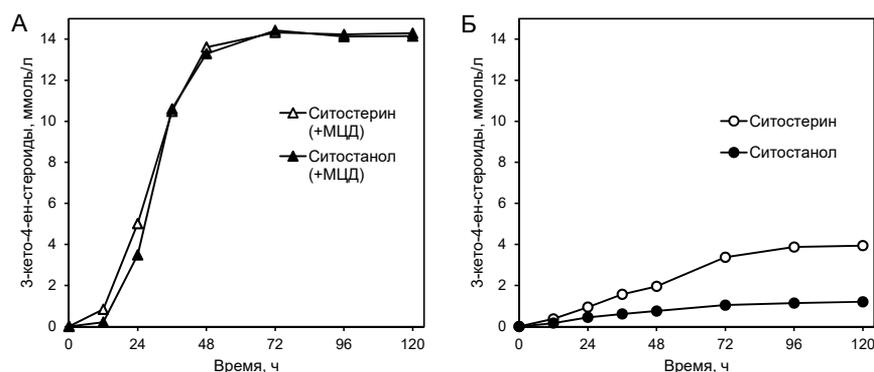


Рис. 3. Биотрансформация фитостерина и ситостанола бактериями *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D. А – в присутствии МЦД; Б – без солюбилизатора

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (соглашение №14-24-00169).

Список литературы

1. Донова, М. В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пушино: Изд-во ОНТИ ПНЦ РАН, 2010.
2. Analysis of free phytosterols/stanols and their intact fatty acid and phenolic acid esters in various corn cultivars. Esche, R., Scholz, B., Engel K-H. J Cereal Sci (2013) 58: 333-340.
3. Wang, S.F., Furuno, T., Cheng, Z., Katoh, S. Composition of neutral fractions in Chinese raw tall oil. J Wood Sci (2001) 47: 400
4. Uhía, I., Galán, B., Kendall, S.L., Stoker, N.G., and García, J.L. (2012) Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: Cholesterol pathway. Environ Microbiol Rep 4: 168–182.
5. A two-step one-pot bioprocess for production of 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterol. Dmitry Dovbnya, Vyacheslav Kollerov, Sergey Khomutov, Danila Malov, Marina Donova. New Biotechnology (2014) 315: S119.

Ассоциации микроорганизмов, деградирующие твердые парафины, ароматические углеводороды и обладающие микотоксической активностью

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

Лаборатория биология плазмид ИБФМ РАН

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

В работе использовали образцы нефтезагрязненных почв, отобранные с территории Ямало-Ненецкого Автономного Округа России и с территории Казахстана. Из образцов было выделено 46 штаммов-нефтедеструкторов, из которых 27 штаммов было выделено с использованием накопительных культур при 28°C, а 19 штаммов – при 4°C. Анализ спектра утилизированных субстратов выявил, что исследуемые микроорганизмы способны к утилизации n-алканов, моно- и полициклических ароматических углеводородов (бензол, этилбензол, фенол, толуол, нафталин, фенантрен) в качестве единственного источника углерода и энергии. Исследование их деградативной активности и физиологических свойств позволило отобрать 8 наиболее эффективных штаммов, перспективных для разработки биопрепаратов.

Согласно результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК 7 исследуемых штаммов принадлежат к роду *Rhodococcus* и один штамм к роду *Pseudomonas*. Исследуемые штаммы-нефтедеструкторы деградировали углеводороды нефти в широком температурном (4-37°C) и рН – диапазоне (4-9), устойчивы к солям (до 7%), продуцируют биоПАВ и могут быть использованы для создания ассоциаций микроорганизмов для использования в технологиях очистки окружающей среды.

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

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

Низкая биодоступность для микробной деструкции многих органических поллютантов, таких как нефть, мазут, креозот, полициклические ароматические углеводороды в значительной степени обусловлены их крайне малой растворимостью в воде, что является одной из причин высокой устойчивости этих поллютантов в окружающей среде. Кроме того, многие биоПАВ обладают антибактериальными и противовирусными свойствами. Исследуемые микроорганизмы снижали поверхностное натяжение культуральной среды до 40 - 60 мН/м, что свидетельствует о выраженной эмульгирующей активности этих штаммов. Для выявления локализации биоПАВ клетки отделяли от культуральной среды и определяли оптическую плотность бесклеточной культуральной среды при добавлении гексадекана. Для штаммов Ф2/2-Н4, Ф2/1-Н4 и К3-Н было показано, что продуцируемые ими биоПАВ не связаны с клеточной стенкой микроорганизмов и продуцируются в культуральную жидкость при росте на гидрофобных субстратах.

Был проведен эксперимент по изучению степени деструкции нефти исследуемыми штаммами в жидкой минеральной среде с 2% нефти при 24°C и 5°C в течение 10 дней. На основании определения степени деструкции нефти индивидуальными штаммами было составлено 4 ассоциации микроорганизмов – эффективных деструкторов углеводородов нефти. Методами гравиметрии и ИК-спектрофотометрии была определена степень биodeградации нефти этими ассоциациями, которая составила от 30 до 70%.

Фракционный анализ остаточных углеводородов после биodeградации нефти позволил выбрать наиболее эффективную ассоциацию. С использованием капиллярной газожидкостной хроматографии была проведена количественная оценка остаточного содержания 13 различных ПАУ (с количеством колец от 3 до 6), а также изучены особенности утилизации н-алканов в образцах, полученных после деградации высоких концентраций нефти (15%) исследуемыми микробными ассоциациями. Показано, что наиболее эффективная ассоциация (*Rhodococcus* sp. Ф2/1-Н4, *Rhodococcus erythropolis* Ф2/2-Н4 и *Pseudomonas putida* BS3701) деградировала 48% исследуемых н-алканов и 38,9% ПАУ (число колец 3 – 6) по сравнению с контролем (среда с нефтью без микроорганизмов).

Современной тенденцией в области экологической биотехнологии является поиск микроорганизмов, одновременно обладающими несколькими полезными свойствами, такими как способность деградировать поллютант в широком диапазоне температур и рН, обладать галотолерантностью, продуцировать биоПАВ, стимулировать рост растений, подавлять патогенные микроорганизмы. Изменение экологического равновесия в условиях нефтяного загрязнения приводит к развитию в почве микроскопических грибов, способных к выделению значительного количества токсинов, подавляющих рост растений. Обнаружено увеличение их численности после загрязнения почв нефтью и уменьшение после рекультивации. Последнее является одним из признаков постепенной нормализации почвенной микробиоты. Принципиальная возможность совмещения углеводородокисляющей и микостатической активности у одного штамма бактерий показана для представителей рода *Pseudomonas*. Однако исследований возможности использования таких микроорганизмов для биорекультивации загрязненных почв в настоящее время крайне мало.

Нами было показано, что наиболее эффективная ассоциация (штаммы-нефтедеструкторы *Rhodococcus* sp. и *Pseudomonas putida*) обладает антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Rhizoctonia* и

Gaeumannomyces, нанесение этих штаммов на газон микромицетов вызывало появление зон ингибирования.

Кроме того, обнаружено, что штамм *Pseudomonas putida* BS3701 обладает фосфатсольбилизирующей активностью. Фосфор - важнейший элемент, обеспечивающий высокую продуктивность растений в сельском хозяйстве. Способность ризосферных бактерий растворять труднодоступные почвенные фосфаты давно рассматривается как важный механизм положительного действия на фосфорное питание растений. Эти бактерии способны к эффективному растворению фосфорных соединений органических фосфатов под действием фосфатаз и к растворению минеральных фосфатов преимущественно за счёт синтеза органических кислот.

Таким образом, разработанная ассоциация обладает одновременно нефтеокисляющей, микостатической и фосфатсольбилизирующей активностями, а также продуцирует биоПАВ.

Работа выполнена при поддержке Казахстанско-российского проекта № 142 «Разработка концепции мониторинга загрязненных нефтью почв Приаральского региона и технологий их очистки с использованием новых биопрепаратов» и гранта «У.М.Н.И.К.» № 0007076.

Трансформация актинобактериями 7(α/β)-гидроксилированных стероидных D-лактонов с 3 β -гидрокси-5-ен-структурой

Лобастова Т.Г., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.

Лаборатория микробиологической трансформации органической соединений
ИБФМ РАН

В последние двадцать лет в связи с ростом различных заболеваний, связанных с нарушениями гормонального баланса в организме человека, а также ростом гормон-зависимых онкологических заболеваний, ведутся интенсивные исследования терапевтического эффекта различных стероидных соединений.

Стероидные 17 α -окса-D-лактоны, в частности тестололактон и тестолактон, проявляют положительные эффекты в лечении рака молочной железы и некоторых форм раннего развития нарушений пубертатного периода [1, 2, 3].

Основным путем получения 17 α -окса-D-лактонов является функционализация стероидной молекулы грибной Байер-Виллигер монооксигеназной системой. Ранее нами была показана возможность одностадийного микробиологического получения 7(α/β)-гидроксилированных 3 β -гидрокси-17 α -окса-D-гомо-андрост-5-ен-17-онов из дегидроэпиандростерона [4]. Получение новых стероидных лактонов возможно путем структурной модификации 17 α -окса-D-лактонов микроорганизмами. Однако, сведения о микробной трансформации стероидов с D-лактонной структурой ограничены.

В настоящей работе предложен микробиологический путь синтеза производных стероидных лактонов посредством трансформации дегидроэпиандростерона грибом *Izaria fumosorosea* VKM F-881 и последовательных конверсий полученных стереоспецифичных гидроксилированных лактонов актинобактериями (рис.).

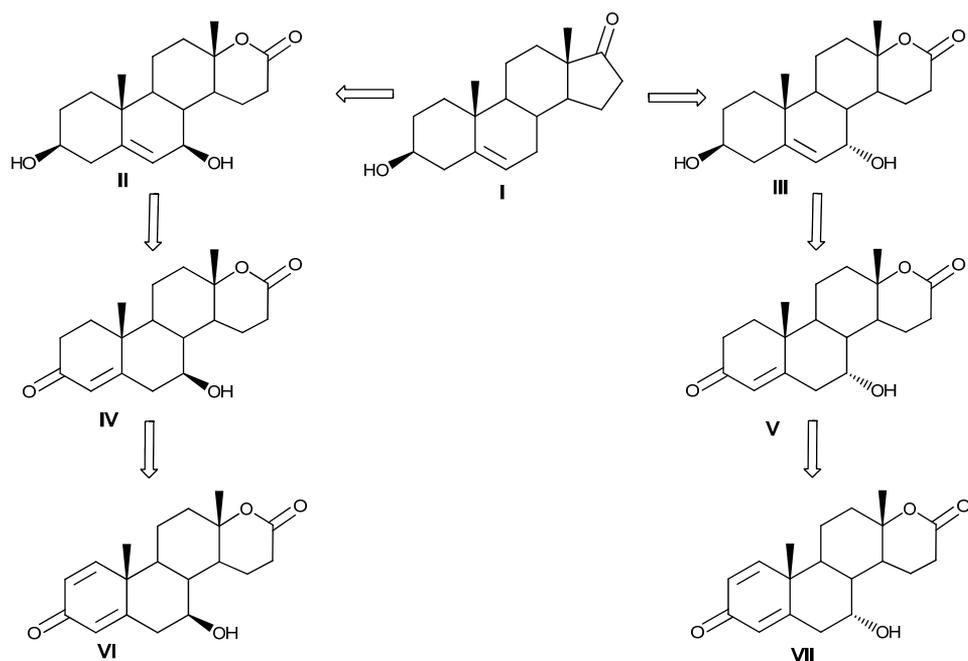


Рис. Путь микробиологический трансформаций ДГЭА (I) с образованием стероидных 3-оксо-7(α/β)-гидроксипроизводных 17 α -окса-D-гомо-лактонов (IV,V,VI,VII): I \rightarrow II, III – *Izaria fumosorosea* VKM F-881; II \rightarrow IV, VI; III \rightarrow V, VII - *Nocardioides simplex* BKM Ac-2033D; II \rightarrow IV, VI; III \rightarrow V, VII - *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* VKM Ac-666; II \rightarrow IV; III \rightarrow V - *Streptomyces parvulus* МТОС Ac-21v

Первая стадия включала получение в препаративных количествах стереоизомеров 3 β ,7(α/β)-дигидрокси-17 α -окса-D-гомо-андрост-5-ен-17-она (II, III). Далее была исследована конверсия полученных 7-гидроксилированных лактонов актинобактериями *Agromyces cerinus* ssp. *cerinus* VKM Ac-1341, *Nocardioides simplex* BKM Ac-2033D, *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* VKM Ac-666 и *Streptomyces parvulus* МТОС Ac-21v. При трансформации 3 β ,7 α -дигидрокси-17 α -окса-D-гомо-андрост-5-ен-17-она (III) и его 7 β -стереоизомера (II) (1 г/л) актинобактериями *N. simplex* Ac-2033D и *S. hirsuta* Ac-666 были получены C₁₉-стероидные лактоны с 3-кето-4-ен-структурой: 7 α -гидрокси-17 α -окса-D-гомо-андрост-4-ен-3,17-дион (V), 7 α -гидрокси-17 α -окса-D-гомо-андроста-1,4-диен-3,17-дион (VII), 7 β -гидрокси-17 α -окса-D-гомо-андрост-4-ен-3,17-дион (IV), 7 β -гидрокси-17 α -окса-D-гомо-андроста-1,4-диен-3,17-дион (VI). Мольный выход полученных продуктов составил 44.5-94.4%. Наличие в продуктах трансформации 3-кето-4-ен-структуры и 1,2-двойной связи свидетельствовало о 3 β -гидроксистероиддегидрогеназной/ $\Delta^{5\rightarrow 4}$ изомеразной и 1,2-дегидрогеназной активности исследуемых штаммов. Для *Streptomyces parvulus* МТОС Ac-21v 1,2-дегидрогеназная активность не была обнаружена. Основным продуктом трансформации был соответствующий гидрокселированный лактон с 3-кето-4-ен структурой. Штамм *Agromyces cerinus* ssp. *cerinus* VKM Ac-1341 не проявлял активности в отношении лактонных субстратов.

Структура стероидных соединений была подтверждена методами масс-спектрометрии и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Мониторинг продуктов трансформации осуществляли методами ТСХ и ВЭЖХ.

Предложенный путь синтеза является примером эффективного применения микробиологической трансформации в качестве альтернативного инструмента в тонком органическом синтезе биологически активных стероидных структур.

Работа была поддержана Российским Научным Фондом (Грант 14-24-00169).

Список литературы

1. Budnick R.M., Dao T.L. Inhibition of estrogen synthesis in human breast tumors by testololactone and bromoandrostenedione. *Steroids*, 1980, V.35, N.5, pp.533-541.
2. Braunstein G.D. Aromatase and gynecomastia. *Endocr. Relat. Cancer*, 1999, V. 6, pp.315-324.
3. Seralini G.-E., Moslemi S. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, V.178, pp.117-131.
4. Лобастова Т.Г., Хомутов С.М., Донова М.В. Формирование гидроксированных стероидных лактонов из дегидроэпиандростерона культурой *Spicaria fumoso-rosea* F-881. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015г., Т. 51, №2, с.174-182.

Биоконверсия 6-(*N*-метил-*N*-фенил)-аминометильных производных ряда андростана штаммом *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

Суходольская Г.В., Фокина В.В., Шутов А.А.,
Николаева В.М., Донова М.В.

Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений
ИБФМ РАН

Введение *N*-метил-*N*-фенил-аминометильных заместителей в структуру стероидов способствует изменению физико-химических свойств, реакционной способности соединений и может влиять на терапевтические эффекты, обусловленные стероидами. Однако, за исключением некоторых 21-ацетиламиностероидов (1), азотсодержащие стероиды ранее в качестве субстратов для биоконверсии микроорганизмами не исследовались.

Актинобактериальный штамм *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д является эффективным биокатализатором, способным к 1-дегидрированию различных 3-кетостероидов. В работе рассмотрено 1-дегидрирование клетками *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д новосинтезированных α/β -диастереомеров 6-(*N*-метил-*N*-фенил)-аминометил-андрост-4-ен-3,17-диона (6-МФА-АД) и 6-(*N*-метил-*N*-фенил)-аминометил-андрост-4-ен-17 β -ол-3-она (6-МФА-Т) по сравнению с их незамещенными аналогами - андрост-4-ен-3,17-дионом (АД) и андрост-4-ен-17 β -ол-3-оном (Т).

Клетки *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д активно проводили 1-дегидрирование 6-МФА-АД и 6-МФА-Т, а также АД и Т. 1-Дегидропроизводные были основными продуктами биоконверсии для всех исследуемых субстратов (рис.1). Структуры стероидов были подтверждены с использованием ВЭЖХ, МС, элементного анализа, ^1H - и ^{13}C -ЯМР.

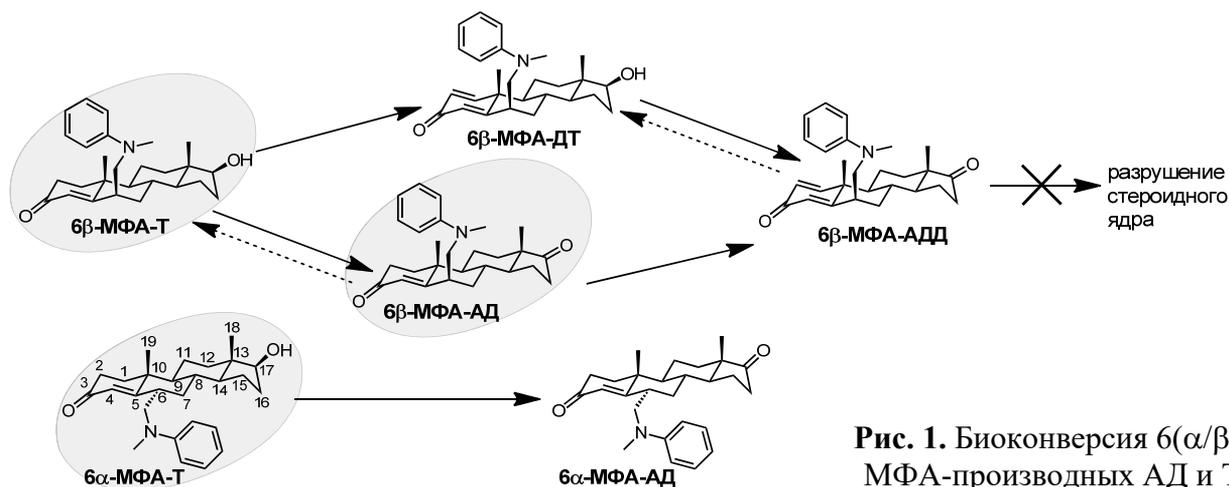


Рис. 1. Биоконверсия 6(α/β)-МФА-производных АД и Т

Наряду с 1-дегидрированием штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д осуществлял окисление гидроксильной группы при С-17 молекулы 6-МФА-Т. Обе изомерные формы 6-МФА-Т: α - и β -были преобразованы в соответствующие 17-кето-производные. В целом, скорость превращения незамещенных андростанов АД и Т была более чем на порядок выше по сравнению с их β -МФА-замещенными аналогами. Одной из возможных причин являлась высокая гидрофобность замещенных субстратов и их затрудненный транспорт в клетки: использование в качестве со-растворителя ДМСО приводило к увеличению степени биоконверсии. При трансформации 6-замещенных андростанов не наблюдалось разрушение стероидного ядра, в то время как оно было существенным, когда штамм инкубировали с незамещенными стероидами АД и Т.

Единственный известный бактериальный путь деградации андростанов включает 9α -гидроксилирование 3,17-дикетостероидов с введённой 1-двойной связью (или 1-дегидрирование 9α -гидрокси-С₁₉-дикетостероидов) с последующим спонтанным расщеплением С-9–С-10 связи и дальнейшей полной деградацией структуры. В соответствии с текущими представлениями об устройстве активного центра 3-кетостероид дегидрогеназы (КстД), α -сторона 3-кетостероида находится в непосредственной близости от изоаллоксазинового кольца ФАД (рис.2).

1-Дегидропроизводные с аксиальной ориентацией заместителей β -МФА-АДД и β -МФА-ДТ накапливались в качестве основных продуктов биоконверсии, в то время как 1-дегидро- α -изомеры не образовывались. Вероятно, экваториальное α -положение объемного сложно устроенного заместителя препятствовало взаимодействию субстрата с КстД. Соответственно, увеличение содержания β -стереоизомера в субстратной смеси α/β -изомеров приводило к повышению выхода его 1-дегидрированных производных. Низкая активность КстД по отношению к β -замещенным андростанам по сравнению с АД или Т может быть объяснена увеличенным размером громоздкого заместителя в аксиальном положении.

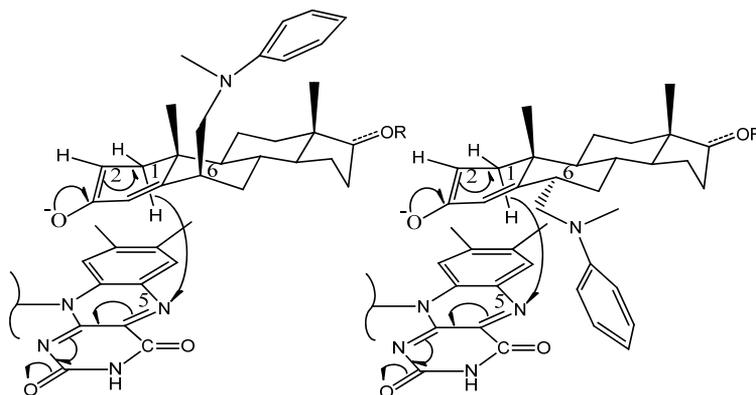


Рис. 2. Предполагаемое влияние α/β -ориентации *N*-метил-*N*-фенил-аминометильного функционального заместителя при С-6 АД или Т (R=0, АД; R=H, Т) на механизм 1-дегидрирования, катализируемый КстД (цитировано по (2))

Допустимый размер аксиального заместителя с β -стороны стероидной молекулы субстрата определен ранее, как боковая цепь, содержащая не более двух атомов углерода (3). Тем не менее, более сложно устроенные β -МФА-АД и β -МФА-Т селективно преобразовывались штаммом в β -МФА-АДД. Для β -замещенных субстратов можно предположить, что в этой ориентации большой, частично гидрофобный и локально полярный заместитель пространственно экранирует активный сайт КстД (2). Как было показано ранее для КстД из *Arthrobacter simplex*, наличие объемных заместителей в

средней части субстрата с α -стороны и, в особенности, в области кольца А ингибирует 1-дегидрирование (3).

Высокая регио-специфичность 3-кетостероид 9 α -гидроксилазы (9 α -КстГ) объясняется характерным связыванием O₂ с негемовым Fe²⁺ в центре каталитического домена (4), а также формой субстрат-связывающего кармана и положением активного центра оксигеназной единицы 9 α -КстГ (КстГА) (5). Аминокислотные остатки всех известных КстГА, отвечающие за взаимодействие со стероидными субстратами, связанными в активном центре, являются консервативными (5). Таким образом, наличие громоздкого заместителя в положении С-6 (в α - и β -ориентации), как представляется, отрицательно влияет на работу активного центра КстГА *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, таким образом, предотвращая 9 α -гидроксилирование и делая невозможным дальнейший путь деградации стероидного ядра. Стоит отметить, что штамм не гидролизует или каким-то другим способом модифицирует (*N*-метил-*N*-фенил)-аминометильный заместитель при С-6, однако, осуществляет модификации стероидного ядра в кольцах А (1-дегидрирование) и D (окисление при С-17).

Результаты работы указывают на высокий потенциал штамма *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д в биоконверсии синтетических стероидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Российский Научный Фонд за финансовую поддержку работы (Соглашение № 14-24-00169).

Список литературы

1. Holland, H. L.; Lakshmaiah, G.; Ruddock, P. L. Steroids 1998, 63 484–495.
2. Rohman, A.; van Oosterwijk, N.; Thunnissen, A.-M. W. H.; and Dijkstra, B. W. J. Biol. Chem. 2013, 288 35559–35568.
3. Penasse, L.; Nomine, G., Eur. J. Biochem. 1974, 47 555–559.
4. Petrusma, M.; van der Geize, R.; Dijkhuizen, L. Antonie van Leeuwenhoek 2014, 106 157–172.
5. Сапык, J. K., D'Angelo, I., Strynadka, N. C., Eltis, L. D. J. Biol. Chem. 2009, 284 9937–9946.

Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis*

Пошехонцева В.Ю.^{1,2}, Фокина В.В.¹, Шутов А.А.¹, Донова М.В.¹

¹ Пушчинский государственный естественно-научный институт

² Лаборатория микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН

Такролимус (FK-506) – высокоактивный иммуносупрессорный препарат, принадлежащий к группе природных макролидов и продуцируемый бактериями рода *Streptomyces*. FK-506, широко используется в трансплантологии для предотвращения отторжения трансплантата, при лечении аутоиммунных и воспалительных кожных заболеваний, обладает выраженной бактерицидной и фунгицидной активностями [1]. Механизм действия такролимуса основан на ингибировании консервативных путей трансдукции, характерных для активации и пролиферации Т-лимфоцитов и роста грибов. Такролимус и другие макролиды проявляют антагонистическую активность в отношении низших эукариот, таких как дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* и др.) и ряда патогенных грибов (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*), значительно

подавляя их рост [2, 3, 4]. Однако влияние клеток эукариот на микробный синтез такролимуса практически не исследовано.

Низшие эукариоты являются источником белков, углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов и др., необходимых для развития актинобактерий и синтеза вторичных метаболитов. Однако биосинтез такролимуса в присутствии дрожжевых экстрактов или автолизатов был крайне низким. На модели *S. cerevisiae* установлено, что для активного биосинтеза такролимуса необходимо присутствие в продуктивной среде целых инактивированных клеток [5]. Предположительно, клетки дрожжей могут служить не только источником питательных веществ, но и индуцировать каскад реакций биосинтеза такролимуса.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния инактивированных целых клеток грибов различного таксономического положения, а также клеточных фракций дрожжей *S. cerevisiae* и эргостерина в качестве потенциальных индукторов биосинтеза такролимуса штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д.

Использовали термически инактивированную биомассу *S. cerevisiae* (порядок *Saccharomycetales*), *Aspergillus ochraceus* (*Eurotiales*), *Curvularia lunata* (*Pleosporales*) и *Gongronella butleri* (*Mucorales*). Грибы культивировали как описано ранее [6, 7, 8]. Полученную биомассу грибов трижды отмывали, высушивали до постоянного веса при 45°C, измельчали и использовали для приготовления продуктивной среды. Клетки *S. cerevisiae* разрушали путем раздавливания замороженной клеточной массы с помощью пресса. Для разделения нерастворимых компонентов клетки и бесклеточного экстракта полученный гомогенат центрифугировали при 800 g в течение 15 мин. Фракции использовали для приготовления продуктивной среды. Влияние эргостерина изучали при его добавлении в физиологическом интервале концентраций к продуктивной среде, содержащей инактивированную биомассу дрожжей *S. cerevisiae*. Посевной материал получали из криогенной культуры *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д на ростовой среде. Биосинтез такролимуса проводили на роторной качалке при 200 об/мин в течение 10 суток при 25°C на среде состава (г/л): растворимый крахмал – 75, кукурузный экстракт – 12,5, сухие хлебопекарные дрожжи – 16,6, глюкоза – 5, глицерин – 5, лизин – 5, CaCO₃ – 3,0, pH 6,8-7,0. В течение ферментации вели подпитку 9% раствором крахмала после 3-х суток роста. Анализ такролимуса проводили ВЭЖХ.

Установлено, что присутствие в среде клеток *A. ochraceus*, также как и *S. cerevisiae* в контроле, оказывает положительный эффект на биосинтез. Максимальный выход FK-506 при этом составил 610 и 660 мг/л, соответственно. При использовании *C. lunata* содержание макролида снижалось на 60% относительно контроля. Присутствие *G. butleri* ингибировало рост культуры-продуцента и синтез FK-506 (рис. 1).

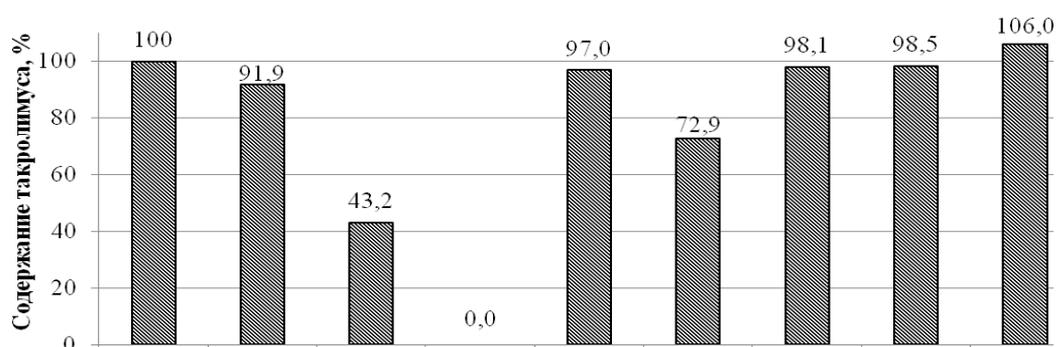
Полученные результаты коррелируют с известными данными о различиях химического состава клеток использованных эукариот, и прежде всего, – строения их клеточных стенок, отличающихся составом полисахаридов, гликопротеинов, хитин-глюкановых (ХГК) и хитозан-глюкановых (ХанГК) комплексов, соотношением хитин/глюкан и хитозан/глюкан. В составе клеточных стенок дрожжей доминируют глюканы и маннаны, содержание хитина не превышает 4%. Наибольшее количество хитина характерно для аспергиллов (20-22%). В отличие от незаряженного хитина, полярный хитозан содержится только у мукоровых грибов (в нашем случае – у *Gongronella butleri*) [9].

Анализ генома/протеома типового штамма *S. tsukubaensis* NRRL 18488 в базе данных NCBI выявил наличие ряда гликозил-гидролаз (К.Ф. 3.2.1), ответственных за расщепление глюканов и хитина, и отсутствие ферментов, гидролизующих хитозан. Полученные нами данные подтверждают, что выход такролимуса снижается в

присутствии эукариот, преимущественно содержащих в составе клеточных стенок глюканы > хитин > хитозан.

При изучении влияния различных клеточных фракций дрожжей *S. cerevisiae* на биосинтез такролимуса *S. tsukubaensis* нами установлен максимальный стимулирующий эффект фракции клеточных стенок: выход FK-506 составил 97% от контроля (применение целых клеток), в то время как при использовании бесклеточного экстракта (растворимой клеточной фракции) биосинтез такролимуса снижался на 27% относительно контроля (рис. 1).

Отличительной особенностью низших эукариот является наличие в их мембранах эргостерина, содержание которого варьирует в дрожжах от 0,2-0,5 масс.% до 10 масс.%. Имеются работы, в которых показана роль эргостерина эукариот как сигнальной молекулы, запускающей каскад реакций биосинтеза ряда антибиотиков и фунгицидов [10]. В нашей работе изучение влияния эргостерина в ряду его увеличивающихся концентраций показало отсутствие эффекта на биосинтез такролимуса (рис. 1).



Клетки и клеточные компоненты низших эукариот

Рис. 1. Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis*

Таким образом, установлен стимулирующий эффект присутствия целых клеток низших эукариот дрожжей *S. cerevisiae* и грибов *A. ochraceus* на биосинтез такролимуса культурой *S. tsukubaensis* ВКМ Ac-2618D и подавление роста и биосинтетической активности стрептомицетов в присутствии хитозан-продуцирующих грибов *G.butleri*. Активация биосинтеза такролимуса в присутствии целых клеток низших эукариот не связана с наличием эргостерина, и зависит преимущественно от состава клеточных стенок низших эукариот.

Список литературы

1. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506) // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 98 (2). P. 497-507.
2. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 томах. – М.: Медицинский совет, 2009. – Т. 2, Ч. 1. 568 с.; Т. 2, Ч. 2. 560 с.
3. Fontaine T., Beauvais A., Loussert C., Thevenard B., Fulgsang C.C., Ohno N., Clavaud C., Prevost M.-C., Latgé J.-P. Cell wall α 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus* // Fungal Genet. Biol. 2010. V. 47 (8). P. 707-712.
4. Arndt C., Cruz M.C., Cardenas M.E., Heitman J. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* // Microbiology. 1999. V. 145 (8). P. 1989-2000.

5. Пошехонцева В.Ю., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В. Биосинтез такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* и селекция высокоактивного морфотипа штамма-продуцента // Мат. II Пуштинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Пушкино, 2015. Сб. тезисов. С. 85-87.
6. Kollerov V.V., Shutov A.A., Fokina V.V., Sukhodol'skaya G.V., Donova M.V. Biotransformation of 3-keto-androstanes by the strain of *Gongronella butleri* VKM F-1033 // J Mol Catalysis B: Enzymatic. 2008. V. 55 (1-2). P. 61-68.
7. Коллеров В.В., Шутов А.А., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Донова М.В. Биоконверсия C₁₉- и C₂₁- стероидов родительским и мутантными штаммами *Curvularia lunata* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 212–220.
8. Dovbnya D., Kollerov V., Khomutov S., Malov D., Donova M. A two-step one-pot bioprocess for production of 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterol // New Biotechnology. 2014. V. 31. P. 119-120.
9. Унрод В.И., Солодовник Т.В. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение // Biopolym. Cell. 2001. Т. 17 (6). С. 526-533.
10. Mendes M.V., Recio E., Antyn N., Guerra S.M., Santos-Aberturas J., Martin J.F., J.F. Aparicio. Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimaricin // Chem. Biol. 2007. V. 14 (3). P. 279–290.

Благодарности: авторы выражают благодарность ООО «Фарминс» за предоставление штамма и финансовую поддержку работы.

Факультативно-метилотрофный фитосимбионт *Delftia* sp. Lp-1, выделенный из клубеньков люпина

***Агафонова Н.В., Капарулина Е.Н., Федоров Д.Н.,
Доронина Н.В., Троценко Ю.А.***

Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

Род *Delftia*, принадлежащий к семейству *Comamonadaceae*, порядку *Burkholderiales*, классу *Betaproteobacteria*, хемоорганотрофные бактерии, типовые представительные способны к метилотрофии. Лишь штамм “*D. tsuruhatensis* VM90”, описанный как высокоэффективный штамм для деградации фенола использует формиат в качестве источника углерода и энергии. Из клубеньков люпина *Lupinus polyphyllus* L. на среде с метанолом нами выделен новый факультативно-метилотрофный штамм Lp-1.

Цель работы – физиолого-биохимическая характеристика, определение механизмов фитосимбиоза и филогенетического положения штамма Lp-1.

Delftia sp. Lp-1 – грамотрицательные подвижные палочки, размножаются бинарным делением. Оптимально растет при температуре 24 - 26°C и pH 7.1 - 7.3, ингибируется 1% NaCl. При росте на среде с метанолом в жирнокислотном составе клеток преобладают C_{16:0}, C_{16:1 ω 9}, C_{18:1 ω 7c}; доминирующие фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и фосфатидилглицерин. Доминирующий убихинон Q₈. Энзиматический анализ показал, что штамм Lp-1 окисляет метанол классической метанолдегидрогеназой и реализует рибулозобисфосфатный путь C₁-метаболизма.

Исследуемый штамм Lp-1 имеет высокий уровень сходства по гену 16S рРНК с представителями рода *Delftia*: 99.9% с *D. lacustris* 332^T (EU888308), 99.8% с *D. tsuruhatensis* T7^T (AB075017), 99.0% с *D. acidovorans* IAM 12409^T (AB021417) и только 94% с недавно описанным видом *D. deserti* YIM Y792^T. Хотя наш изолят ближе всего по филогенетическому положению к *D. lacustris* 332^T, показано, что типовая культура не растет на метаноле. Содержание Г+Ц в ДНК у штамма Lp-1 составляет 66.9 мол% (T_{пл}).

Анализ транслированной аминокислотной последовательности большой субъединицы метанолдегидрогеназы MxaF штамма Lp-1 выявил 85.5 - 94% сходства с таковыми у представителей автотрофных метилотрофов класса *Alphaproteobacteria* – *Angulomicrobium*, *Starkeya*, *Ancylobacter*, что может свидетельствовать о приобретении гена *mxaF* при горизонтальном переносе. Кроме того, выявлено наличие гена *хохF*, предположительно кодирующего гомолог белка MxaF. Анализ транслированной аминокислотной последовательности гена *хохF* выявил 83 - 95,4% сходства с таковыми у представителей родов *Bosea*, *Starkeya*, *Ancylobacter* и *Methylobacterium*.

Первый метилотрофный представитель рода *Delftia* – *Delftia* sp. Lp-1 (VKM B-3039, DSM 24446), является фитосимбионтом, поскольку в опытах *in vitro* показана стимуляция роста и морфогенеза растений салата (*Lactuca sativa* L.), гороха (*Pisum sativum* L.), фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.). При инокуляции семян штаммом *Delftia* sp. Lp-1 ростки растений, колонизованные метилотрофом (опытные), были в 2-4 раза выше стерильных (контрольных); также в 2 раза увеличивалась масса корневой системы и количество боковых корней в опыте по сравнению с контролем. В микровегетационных экспериментах на растениях томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) отмечали повышение уровня фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* – на 33%, каротиноидов – на 50%) и удельной плотности листовой пластинки (на 16.6 - 18.7%) опытных растений.

У *Delftia* sp. Lp-1 выявлена способность к фосфатсольюбилизации. На среде с метанолом и нерастворимым $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (в качестве единственного источника фосфора) концентрация свободных фосфатов достигала до 237 ± 6.1 мкг/л. Обнаружено, что исследуемый штамм синтезирует фитогормоны-ауксины (3 - 7 мкг/мл культуральной жидкости), сидерофоры катехольного типа, имеет ген азотфиксации *nifH*, проявляет антагонистическую активность к фитопатогенным грибам (*Verticillium albo-atrum*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solani*) и представителям рода *Bacillus* (*B. subtilis* subsp. *subtilis* BD170 и *B. cereus* ATCC 14579).

Таким образом, впервые описан метилотрофный представитель рода *Delftia*, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений. Кроме того, показано, что *Delftia* sp. Lp-1 является фитосимбионтом, поскольку обладает широким спектром механизмов стимуляции роста растений.

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

Аэробные метилотрофные бактерии из ризосферы растений

Каратаева Т.А., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.

Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН
Пушчинский государственный естественно-научный институт

Аэробные метилотрофные бактерии, использующие одноуглеродные (C_1) соединения в качестве источника углерода и энергии, широко распространены в природе, и часто являются симбионтами растений. Ассоциация метилотрофов с растениями обусловлена тем, что C_1 -соединения являются естественными продуктами метаболизма растений и позволяет метиловым бактериям успешно конкурировать с другими микроорганизмами в филосфере и ризосфере растений [1].

В последнее годы большое внимание было уделено исследованию филосферных метилотрофов, тогда как разнообразие метилотрофов, ассоциированных с ризосферой растений изучено недостаточно. Исходя из этого целью нашего исследования было изучение разнообразия метилотрофных бактерий, колонизирующих ризосферу растений различных природных сообществ на территориях Тульской и Московской областей. В

ходе эксперимента исследовали 4 пробные площади, на которых были отобраны растения (мышинный горошек *Vicia cracca*, донник жёлтый *Melilotus officinalis*, люцерна серповидная *Medicago falcata*, чина луговая *Lathyrus pratensis*, чина клубненосная *L. tuberosus*, чина весенняя *L. Vernus*, астрагал нутовый *Astragalus cicer*, клевер луговой *Trifolium pratense*, клевер ползучий *T. repens*, клевер средний *T. medium*, лядвенец рогатый *Lotus corniculatus*, вязель разноцветный *Coronilla varia*, морковь дикая *Daucus carota*, гречиха посевная *Fagopyrum esculentum*).

Корни и плоды растений помещали в колбы объёмом 750 мл, содержащих 200 мл среды К с добавлением метанола до концентрации 0,5% (об/об) и культивировали в течение двух дней. После трёх пассажей на жидкой среде накопительные культуры высевали на агаризованную среду «К» с метанолом (2% об/об) [2]. Затем дважды производили рассев до единичных колоний для получения чистых культур. В результате получено 20 штаммов чистых культур розовоокрашенных факультативных и 10 штаммов бесцветных аэробных метилотрофных бактерий.

Для идентификации штаммов метилотрофов использовали анализ последовательностей генов 16S рРНК. Для этого из полученных штаммов выделили геномную ДНК. Фрагменты генов 16S рРНК амплифицировали ПЦР, используя универсальные для генов 16S рРНК бактерий праймеры 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5'-AAGGAAGGTGATCCAGCTCGT-3'). Предварительный рестрикционный анализ фрагментов генов 16S рРНК эндонуклеазами рестрикции TaqI и AluI позволил выявить идентичные и похожие на типовые штаммы. Фрагменты генов 16S рРНК, отличающихся по рестрикционному профилю штаммов, были секвенированы.

Предварительный поиск нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых штаммов проводили с использованием данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [3]. Для более точного определения филогенетического положения нуклеотидные последовательности 16S рДНК выравнивали вручную с последовательностями референтных штаммов ближайших микроорганизмов с помощью программы CLUSTAL W с соответствующими последовательностями [4], доступными из последней версии базы данных NCBI Database Project. Построение укорененного филогенетического дерева производили методом neighbor-joining (NEIGHBOR), реализованным в пакете программы MEGA5 [5].

В результате установлено, что 11 штаммов принадлежат к виду *Methylobacterium extorquens* (AstPu5, CorPu2, MedPu6, ViSh1, MelPu, LoSh1, LaTPu, TriP2, TriPP7.4, FaP12, Fag3), 3 штамма близки к *M. radiotolerans* (Tri4, LaPb2, Plathyr3), по 1 к *M. fujisawaense* (Fag15), *M. adhaesivum* (Das4.3) и роду *Methylopila* (FaP14.1). Штаммы TriM08.1 и Dau2 принадлежат к роду *Ancylobacter* (Таблица 1).

Таблица 1

Место выделения	Штамм	Растение/орган растения	Предположительная видовая принадлежность
Пушино МО	AstPu5	<i>Astragalus cicer</i> /пизосфера	<i>M. extorquens</i>
	CorPu2	<i>Coronilla varia</i> /пизосфера	<i>M. extorquens</i>
	MedPu6	<i>Medicago falcate</i> /пизосфера	<i>M. extorquens</i>
	MelPu	<i>Melilotus officinalis</i> /пизосфера	<i>M. extorquens</i>

	LaTPu	<i>Lathyrus tuberosus</i> /ризосфера	<i>M. extorquens</i>
	LaPb2	<i>Lathyrus tuberosus</i> /бобы	<i>M. radiotolerans</i>
	TriPP7.4	<i>Trifolium pratense</i> /ризосфера	<i>M. extorquens</i>
	FaP12	<i>Fagopyrum esculentum</i> /плоды	<i>Methylopila</i>
	Fag3	<i>Fagopyrum esculentum</i> /ризосфера	<i>M. extorquens</i>
	Tri4	<i>Trifolium pratense</i> /ризосфера	<i>M. radiotolerans</i>
	Plathyr3	<i>Lathyrus Vernus</i> /ризосфера	<i>M. radiotolerans</i>
	Fag15	<i>Fagopyrum esculentum</i> /ризосфера	<i>M. fujisawaense</i>
	Das4.3	<i>Daucus carota</i> /плоды	<i>M.adhaesivum</i>
	FaP14.1	<i>Fagopyrum esculentum</i> /плоды	<i>M. extorquens</i>
	TriM08.1	<i>Trifolium medium</i> /ризосфера	<i>Ancylobacter</i>
	Dau2	<i>Daucus carota</i> /ризосфера	<i>Ancylobacter</i>
д. Шилов ТО	ViSh1	<i>Vicia cracca</i> /ризосфера	<i>M. extorquens</i>
	LoSh1	<i>Lotus corniculatus</i> /ризосфера	<i>M. extorquens</i>

Для штаммов с высокой идентичностью нуклеотидных последовательностей с известными видами был применен метод случайной амплификации полиморфной ДНК – RAPD-ПЦР (random amplified polymorphic DNA) анализ. Продукты ПЦР разделены при помощи электрофореза в агарозном геле. Уникальные профили амплифицированных продуктов позволили отделить штаммы TriM08.1 и Dau2 от уже известных видов рода *Ancylobacter*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №13-04-01520-а.

Список литературы

1. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных метиловобактерий: новые факты и гипотезы // Микробиология. 2011 г. Т. 80. №4. С. 443-454.
2. Доронина Н.В. Биоразнообразие и таксономия аэробных метиловобактерий // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пушино. 1999. 32 с.
3. <http://ncbi.nlm.nih.gov>
4. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. // Bioinformatics. 2007. V. 23. P. 2947-2948.
5. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739

**Физиологические и филогенетические аспекты метаболизма
сахарозы у термофильного метанотрофа
Methylocaldum szegediense O12**

Бут С.Ю., Егорова С.В., Солнцева Н.П.

Лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

Сахароза – один из самых распространенных углеводов в природе. Ранее *de novo* синтез сахарозы приписывался только фотосинтетическим организмам (растения, цианобактерии, сине-зеленые водоросли), поскольку данный дисахарид является основным продуктом фотосинтеза. Однако в последнее время накопление сахарозы, а также присутствие и функциональность генов метаболизма сахарозы было продемонстрировано у ряда протеобактерий (Chua et al., 2008; Dirick et al., 2015), в том числе у метилотрофных бактерий (Khmelenina et al. 1999; Doronina et al. 2003; Бут с соавт., 2013; But et al. 2013; But et al., 2015) – особой группы микроорганизмов, использующих метан и/или его окисленные и замещенные производные в качестве единственного источника углерода и энергии. У всех организмов, включая растения, синтез сахарозы осуществляется при участии двух ферментов: сахарозофосфатсинтазы (Sps; УДФ-глюкоза:D-фруктозо-6-фосфат-2- α -D-глюкозилтрансферазы, КФ 2.4.1.14) и сахарозофосфатфосфатазы (Sprr; сахарозо-6-фосфат фосфогидролазы, КФ 3.1.3.24). У ряда организмов присутствует фермент сахарозосинтаза (УДФ-глюкоза:D-фруктоза 2- α -D-глюкозилтрансфераза, КФ EC 2.4.1.13), катализирующий обратимую реакцию синтеза, однако считается, что данный фермент участвует лишь в деградации сахарозы (Winter and Huber, 2000; Cumino et al., 2007, 2008). Новый путь деградации сахарозы, включающий ферменты амилосахаразу (КФ 2.4.1.4) и АТФ-зависимую фруктокиназу обнаружен у метанотрофа *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z а также у цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7002 (But et al., 2015; Perez-Cenci and Salerno, 2014).

У термофильного метанотрофа *Methylocaldum szegediense* O12 ранее было продемонстрировано накопление сахарозы, а также обнаружены активности сахарозофосфатсинтазы в грубых экстрактах (Медведкова с соавт., 2007). Несмотря на это, в секвенированном недавно геноме данного метанотрофа не было обнаружено кластера, отвечающего за метаболизм сахарозы, обычно включающего гены сахарозофосфатсинтазы, фруктокиназы, амилосахаразы и иногда сахарозофосфатфосфатазы и присутствующего у всех метилотрофных и хемоавтотрофных бактерий, реализующих *de novo* синтез данного углеводорода. Однако был обнаружен ген сахарозосинтазы и дивергентно расположенные гены, аннотированные как “putative D-inositol-3-phosphate glycosyltransferase”, “putative HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIb”, “mannose-1-phosphate guanyltransferase ” и “PfkB domain protein”. Нами было предположено, что продукты данных генов участвуют в метаболизме сахарозы у *M. szegediense* O12.

Препологаемая сахарозофосфатсинтаза (изначально аннотированная как инозитол-3-фосфатглюкозилтрансфераза) проявляла умеренное сходство с сахарозофосфатсинтазами других метилотрофов (порядка 35% идентичности аминокислотной последовательности), а гидролаза HAD-семейства была гомологична сахарозофосфатфосфатазам хемоавтотрофных и метилотрофных бактерий (32-35% идентичности). При этом предполагаемые Sps и Sprr *M. szegediense* на филогенетическом дереве кластеризовались отдельно от ферментов других метилотрофов, что подразумевает иное происхождение синтеза сахарозы у *M. szegediense* O12. Гены *sps* и *spp* были клонированы и гетерологичной экспрессией в *E. coli* были получены рекомбинатные ферменты и показано, что они катализируют синтез сахарозо-6-фосфата из УДФ-глюкозы и фруктозо-

6-фосфата и гидролиз сахарозо-6-фосфата с образованием сахарозы, соответственно. Несмотря на низкий уровень сходства и филогенетические различия, ферменты из *M. szegediense* O12 демонстрировали свойства, схожие со свойствами охарактеризованных бактериальных и цианобактериальных сахарозофосфатсинтаз и сахарозофосфатфосфатаз. Sps проявляла максимальную активность при 50-55°C и pH 6.5. Зависимость активности от концентраций обоих субстратов подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен ($V_{max} = 1.23 \pm 0.07$ Ед/мг белка, кажущиеся K_m для УДФ-глюкозы и фруктозо-6-фосфата 13 ± 2 и 0.54 ± 0.05 мМ, соответственно). Сахарозофосфатфосфатаза имела pH оптимум 6.5 и температурный 45°C и также подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен ($V_{max} = 53 \pm 1$ Ед/мг белка, $K_m = 0.2 \pm 0.015$ мМ).

Препарат рекомбинантной сахарозосинтазы также был получен гетерологичной экспрессией в клетках *E. coli*. Фермент катализировал как распад сахарозы в присутствии АДФ и УДФ (температурный оптимум 55°C, pH оптимум – 7,5), так и ее синтез из фруктозы и АДФ- или УДФ-глюкозы (максимальная активность при 45°C и pH 8.0). Сахарозосинтаза *M. szegediense* O12 в отличие от растительных и цианобактериальных ферментов предпочитательнее использовала АДФ, а не УДФ в качестве субстрата (Табл. 1), что указывает на связь метаболизма сахарозы с синтезом гликогена у *M. szegediense* O12, поскольку известно, что АДФ-глюкоза является прекурсором синтеза данного полисахарида.

Таблица 1

Кинетические свойства рекомбинантной сахарозы из *M. szegediense* O12

	V_{max} , Ед/мг	$S_{0.5}$, мМ	n	$V_{max}/S_{0.5}$
Сахароза (АДФ)	2.6±0.2	110±20	0.90±0.08	0.024
АДФ		0.2±0.01	0.82±0.05	13
Сахароза (УДФ)	1.43±0.03	600±150	1.2±0.2	0.0024
УДФ		2.9±0.4	1.1±0.1	0.5

Предполагаемый PfkV domain protein был также получен в виде рекомбинантного фермента и было показано, что он катализирует АТФ-зависимое фосфорилирование фруктозы до фруктозо-6-фосфата и, следовательно, является фруктокиназой. Рекомбинантная фруктокиназа проявляла максимальную активность при 55-60°C и pH 8.5 и была строго специфична к фруктозе, как к донору фосфорильной группы ($V_{max} = 58 \pm$ Ед/мг белка, $K_m^{каж}$ (АТФ) = 0.88 ± 0.07 мМ, $K_m^{каж}$ (фруктоза) = 0.93 ± 0.05 мМ).

Таким образом, *Methylocaldum szegediense* O12 аналогично другим метилотрофам реализует синтез сахарозы при участии ферментов сахарозофосфатсинтазы и сахарозофосфатфосфатазы, однако метаболизирует данный дисахарид с помощью сахарозосинтазы, но не амилосахаразы. В то время, как амилосахараза напрямую переносит гликозильный остаток сахарозы на гликоген, сахарозосинтаза участвует в образовании АДФ-глюкозы, служащей субстратом гликогенсинтазе. Образующаяся при этом фруктоза может заново активироваться и вовлекаться в метаболизм при участии фруктокиназы.

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

Белок SgpR способен взаимодействовать с регуляторной областью «классического» *nahI*-оперона

Филатова И.Ю.¹, Жигулев А.А.², Захарова М.В.¹

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² ФГБОУ ВО ТулГУ

Мозаичная теория эволюции современных катаболических путей предполагает сборку катаболических модулей путем транспозиционных событий (Williams and Sayers, 1994; Bosch et al., 1999a, 2000). Гены, участвующие в одном метаболическом пути, должны работать координировано, поэтому у бактериальной клетки возникает необходимость в тонкой регуляции экспрессии "приобретенных" генов без привлечения дополнительных регуляторных элементов, которые могут являться лишь нагрузкой на белок-синтезирующий аппарат клетки. Штамм *Pseudomonas putida* AK5, первый описанный природный штамм, в котором присутствуют как «классические» *nahI*-оперон и ген *nahR* (деградация нафталина до салицилата через образование катехола), так и гены, продукты которых отвечают за менее охарактеризованный путь деградации салицилата через гентизат (*sgp*-оперон, *salicylate – gentisate pathway*). Целью работы было оценить вклад транскрипционного фактора SgpR, негомологичного «классическим» NahR – похожим белкам, в изменение активности генов катаболизма нафталина.

Первым этапом нашей работы являлось доказательство способности белка SgpR образовывать комплекс с регуляторной областью *nahI*-оперона *in vitro*. Для этого предварительно методом ПЦР был получен фрагмент *nahI*-оперона, содержащий сайт связывания «классического» регуляторного белка NahR, а также фрагмент *sgp*-оперона содержащий сайт связывания транскрипционного регулятора SgpR.

Транскрипционный регулятор SgpR образует комплекс с регуляторной областью *nahI*-оперона. С регуляторной областью *sgp*-оперона образуется один комплекс, и вся ДНК связывается при 2,4 мкМ белка. В регуляторной области *nahI*-оперона при такой же концентрации не происходит связывания всей ДНК и наблюдается два комплекса. Можно сделать предположение, что в регуляторной области *nahI*-оперона может присутствовать еще один оператор либо о наличии неспецифического взаимодействия.

Для дальнейшего исследования участия белка SgpR в регуляции транскрипции *nahI*-оперона *in vivo* была создана *fusion* конструкция *nahI::lacZ* на базе плазмидного вектора p184LacZH3W. Помимо вектора содержащего указанную химерную конструкцию проводили трансформацию штамма *E.coli* Z85 плазмидой pQE30/*sgpR*, в которой экспрессия транскрипционного регулятора находится под контролем репрессора LacI. Независимо от присутствия индуктора (салицилата) в селективной среде МакКонки колонии, содержащие конструкцию *nahI::lacZ* были окрашены красным. Это должно указывать на наличие постоянной, конститутивной, экспрессии β-галактозидазы, независимой от присутствия транскрипционного регулятора SgpR.

Определение общего уровня транскрипции с промотора генов *nahI*-оперона указанной химерной конструкции было выполнено при помощи обратной транскрипции и ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени. Для этого из клеток *E.coli* Z85, культивируемых, как в присутствии, так и в отсутствии салицилата натрия, выделяли тотальную РНК. Методом обратной транскрипции, при помощи праймеров комплементарных нуклеотидным последовательностям гена *lacZ*, была получена кДНК. Далее полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения *real-time PCR*. Уровень транскрипции с промотора генов *nahI*-оперона определяли по значениям

порогового цикла (Ср). Вычисление уровней транскрипции проводилось с учетом того, что концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N – количество циклов амплификации. В качестве нормировочного выбран ген резистентности к хлорамфениколу (маркерный ген плазмиды p184). Уровень экспрессии с промотора *nahI*-оперона в присутствии SgpR и в отсутствии салицилата ~ в 5 раз выше уровня экспрессии с промотора *sgp*-оперона, что свидетельствует о некоем фоновом уровне экспрессии генов «верхнего пути». При добавлении индуктора (в присутствии SgpR) наблюдается увеличение экспрессии репортерного гена в ~5 раз, что может указывать на участие транскрипционного фактора SgpR в активации транскрипции генов «классического» *nahI*-оперона. Данные получены с использованием гетерологичной системы экспрессии, поэтому в дальнейшей работе планируется создание штаммов дефектных по генам *nahR* и *sgpR* в отдельности и в совокупности и оценка экспрессии генов *nahI*-оперона в полученных мутантных штаммах и штамме дикого типа.

О причине ингибирующего влияния лёгких фракций углеводородов нефти на биоту почвы

Шкидченко А.Н.

Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

Одним из наиболее опасных веществ, загрязняющих среду обитания, в силу своих свойств и масштабов использования является нефть. Загрязненные нефтью почвы могут обычно превращаются в техногенные пустыни, в которых практически полностью подавлена жизнедеятельность биоты, нарушены основные свойства почв. Однако, не только при массивованных разливах нефти, но и в зоне автозаправочных станций (где нефти нет) образуются техногенные пустоши, несмотря на то, что лёгкие фракции нефтепродуктов (бензин и дизельное топливо) быстро испаряются с поверхности почвы.

Биодеградацию нефтепродуктов различной степени конденсации исследовали в модельном почвенном эксперименте (200 сут при 6°C) с использованием предварительно селекционированных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов. При этом отмечено снижение содержания углеводов в почве ещё до внесения микроорганизмов-нефтедеструкторов (Табл.).

Определение углеводов нефти в образцах почвы

Характеристики образца	Количество углеводов в образце, г/кг почвы					
	Дизельное топливо		Нефть		Мазут	
Внесено	50	100%	50	100%	50	100%
Определено аналитически после внесения	37,2	74,4%	42,0	84,0%	50	100%
Потери в результате сорбции почвой	12,8	25,6%	8,0	16,0%	0	0%

По-видимому, лёгкие фракции нефтепродуктов способны связываться с гуминовым комплексом почвы и не поддаются экстракции. Дополнительные исследования методом масс-спектрометрии подтвердили данное предположение: в случае нефти в контрольной

почве при измерении было «потеряно» 16,0% от внесенного количества, в случае дизельного топлива – 25,6%.

Одной из функций гуминового комплекса почвы является обеспечение питания микроорганизмов и растений путём регулирования окислительно-восстановительных условий и растворимости минеральных компонентов.

Нами исследована динамика фракций гуминовых веществ в процессе биodeградации нефтепродуктов в почве по методу Тюрина в модификации Понаморёвой (рис.).

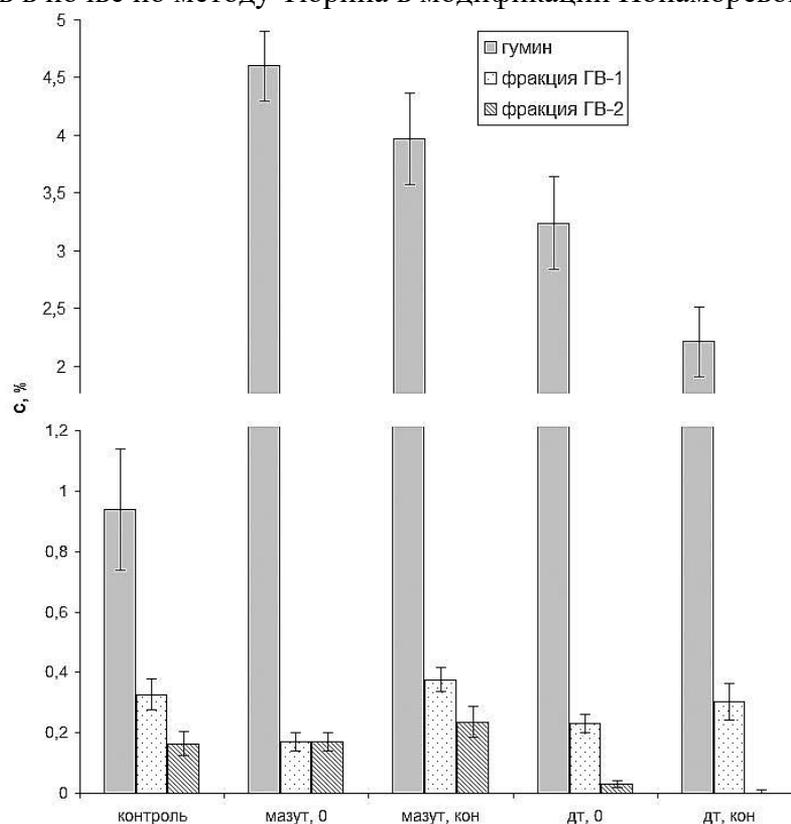


Рис. Динамика фракций гуминовых веществ в ходе биodeградации нефти в модельной Почве (С – содержание углерода гуминовых веществ относительно общего углерода, в том числе внесённых углеводов)

Оказалось, что гуминовые вещества щелочной вытяжки из декальцинированной серной кислотой почвы (фракция ГВ-2) при ассимиляции углеводов нефти и дизельного топлива обнаруживаются на уровне следовых количеств, т.е. связываются легкими углеводородами.

Для оценки возможной фитотоксичности лёгких фракций в почву вносили нефть и дизельное топливо в разных концентрациях при выращивании ячменя. При концентрации в почве 2% дизельного топлива семена проросли, дали зачатки ростков и корней, но далее не развивались. Семена не были покрыты плёнкой из нефтепродуктов, структура почвы и её влажность были приемлемыми для роста растений. Остановка роста, по-видимому, была связана не с прямым физическим или химическим действием загрязнителей, а с нарушением (блокировкой) питания прорастающих семян.

Таким образом, при проведении биоремедиации загрязнённых нефтепродуктами почв одновременно с внесением биопрепаратов необходимо внесение минеральных удобрений для компенсации неорганических ионов, связанных комплексом «гумин – лёгкие фракции нефти».

Особенности выбора штаммов ризосферных псевдомонад, перспективных для создания биопрепаратов

Сизова О.И., Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Кочетков В.В.

Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

В основе микробиологических биопрепаратов часто используют бактерии группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений). При этом считается, что чем больше у бактерий набор свойств, полезных для растений, тем эффективней будет биопрепарат. Однако недавно, вопреки ожиданиям, было показано, что псевдомонады с большим количеством полезных свойств, при инокуляции растений не оказывали фитостимулирующий эффект [1] или вытеснялись в ризосфере штаммами с меньшим количеством свойств [2].

В результате скрининга 477 ризосферных изолятов нами было отобрано 12 флуоресцирующих штаммов псевдомонад, способных к биоконтролю фитопатогенов. При этом 8 штаммов *P. chlororaphis* P4-1, Kz31, Or3-3 и IG1, *P. fluorescens* IC7, *P. putida* O9-10, *P. protegens* P4-2, *P. brassicacearum* Kz21 оказались наиболее активными колонизаторами ризосферы однодольных (пшеница) и двудольных (горчица) растений: в стерильных вегетационных экспериментах их титр составил порядка 10^8 – 10^9 КОЕ/г сырой массы корней. Впоследствии было отобрано 5 штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков, обладающих высокой антагонистической активностью против фитопатогенных грибов (*Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) и бактерий (*Burkholderia caryophylli* и *Pectobacterium carotovorum*): *P. chlororaphis* P4-1, IG1, Kz31, Or3-3 и *P. putida* O9-10. Штаммы *P. chlororaphis* P4-1, IG1 и Kz31, выделенные из различных регионов — Московской обл., Татарстана и Краснодарского края, соответственно, имели одинаковый набор PGPR-свойств. Эти штаммы помимо феназин-1-карбоновой кислоты (ФКК) синтезировали ряд окси-феназинов (ОН-Фен), а также цианид водорода, индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и поверхностно-активные вещества (ПАВ) (Таблица). Штаммы *P. chlororaphis* Or3-3 и *P. putida* O9-10 имели иной спектр феназиновых антибиотиков — ФКК и феназин-1-карбоксамид (ФКА), однако в экстрактах культуральной жидкости у штамма Or3-3 мажорным соединением был ФКА, а у штамма O9-10 — ФКК. По имеющимся литературным данным у представителей вида *P. putida* способность продуцировать ФКА до настоящего времени не описана. Нами было показано, что инокуляция семян пшеницы штаммами *P. chlororaphis* с повышенной продукцией ИУК (более 10 мкг/мл) не стимулировала рост корней 3-х суточных проростков. В то время как инокуляция семян штаммами *P. putida* O9-10 и *P. fluorescens* IC7 (продуцент ФКК) с низким уровнем ИУК (4.8 и 3.2 мкг/мл, соответственно) достоверно увеличивала суммарную длину корней проростков на 10 и 20%, соответственно. Ранее сообщалось, что ФКК ингибирует рост корней проростков [3], в то же время известно, что окси-феназиновые производные и ФКА являются более активными антибиотиками против фитопатогенов, по сравнению с ФКК. Полученные данные свидетельствуют о том, что при инокуляции семян штаммами PGPR необходимо учитывать не только их способность к продукции высокого уровня ауксинов и антибиотиков, но также природу феназиновых производных. Штаммы *P. protegens* P4-2 и *P. lurida* P6-1 не синтезировали феназиновые антибиотики, однако проявляли умеренную антагонистическую активность: штамм P4-2 — против бактерий *B. caryophylli* и *P. carotovorum*, а штамм P6-1 — против гриба *G. graminis* var. *tritici*. Выявление других антибиотиков не феназиновой природы у этих штаммов представляет определенный интерес, поскольку оба штамма обладают рядом полезных для растений свойств: помимо

продукции ИУК, штамм Р4-2 синтезируют ПАВ, а штамм Р6-1 растворяет малоподвижные формы фосфатов и стимулирует рост корней растений. Штамм *P. brassicacearum* Кr21, хотя и не является антагонистом фитопатогенов, однако синтезирует HCN, ИУК, растворяет фосфаты и на 20% увеличивает суммарную длину корней проростков. Виды *P. brassicacearum* и *P. lurida* были определены сравнительно недавно [4, 5]. Описано как положительное [6, 7], так и патогенное [8, 9] влияние этих видов на растения. В связи с этим несомненный интерес представляют дальнейшие исследования PGPR-потенциала штаммов *P. lurida* Р6-1 и *P. brassicacearum* Кr21.

Все исследованные нами штаммы обладают различным набором PGPR-свойств, которые проявляются в лабораторных экспериментах. При создании биопрепаратов на основе этих штаммов необходимо проведение долгосрочных полевых экспериментов, для подтверждения их стимулирующих/защитных свойств в различных почвенно-климатических условиях.

Таблица

Характеристика новых штаммов PGPR *Pseudomonas*

ШТАММЫ	БИО-КОНТРОЛЬ ФИТОПАТОГЕНОВ	ФЕНАЗИНОВЫЕ АНТИБИОТИКИ	РАСТВОРЕНИЕ ФОСФАТОВ	ПРОДУКЦИЯ			СТИМУЛЯЦИЯ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ
				HCN	ПАВ	ИУК, МКГ/МЛ	
<i>P. CHLORORAPHIS</i> Р4-1	+	ФКК, ОН-ФЕН	-	+	+	12.6	Н.О.*
<i>P. CHLORORAPHIS</i> IG1	+	ФКК, ОН-ФЕН	-	+	+	13.4	Н.О.
<i>P. CHLORORAPHIS</i> KR31	+	ФКК, ОН-ФЕН	-	+	-	17.6	Н.О.
<i>P. CHLORORAPHIS</i> OR3-3	+	ФКК, ФКА	-	+	-	11.2	Н.О.
<i>P. FLUORESCENS</i> P2-1	-	-	+	-	+	5.4	Н.О.
<i>P. FLUORESCENS</i> A1*	±	ФКК	-	-	±	8.4	Н.О.
<i>P. FLUORESCENS</i> IC7*	±	ФКК	-	-	-	3.2	+20%**
<i>P. PUTIDA</i> P8-2	-	-	+	-	-	12.6	+20%
<i>P. PUTIDA</i> O9-10	+	ФКК, ФКА	+	+	±	4.8	+10%
<i>P. PROTEGENS</i> P4-2	+	-	+	+	+	5.6	Н.О.
<i>P. LURIDA</i> P6-1	±	-	+	-	±	4.5	+12%
<i>P. brassicacearum</i> Кr21	-	-	+	+	-	4.0	+20%

*н.о. – не обнаружено, ** – прибавка относительно контроля (растения без инокуляции).
 “±” – СЛАБОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКА, “-” ОТСУТСТВИЕ ПРИЗНАКА.

Список литературы:

1. Cardinale M., Ratering S., Suarez C. et al. // *Microbiol. Res.* 2015. V. 181. P. 22–32.
2. Vacheron J., Moenne-Loccoz Y., Dubost A. et al. // *Front. Plant sci.* 2016. V. 7. Article 1212.
3. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. / Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990.
4. Achouak S.L., Sutra L., Heulin T. et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 9–18.
5. Behrendt U., Ulrich A., Schumann P. et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. Pt. 5. P. 979–985.
6. Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A. et al. // *Can. J. Microbiol.* 2001. V. 47. P. 642–652.
7. Selvakumar G., Joshi P., Suyal P. et al. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 27. Iss. 5. P. 1129–1135.
8. Belimov A., Dodd I.C., Safronova V., Davies W.J. // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 1485–1495.
9. Lee D.W., Jin-Sung Hong J.-S., Sun-Hyung Kim S.-H., et al. // *J. Phytopathology.* 2014. V. 162. № 3. P. 195–200.

Оценка углеводородоокисляющей активности микроорганизмов Балтийского моря

***Соколов С.Л., Сазонова О.И., Гафаров А.Б., Иванова А.А.,
Ветрова А.А., Кошелева И.А.***

Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

Ликвидация нефтяных разливов на море имеет целью как уменьшение экологического ущерба, так и снижение социально-экономических последствий загрязнения акватории. Микробная ремедиация загрязненных углеводородами почв является доступным и экологически безопасным методом очистки окружающей среды, поэтому желательна разработка подобных технологий и для морских экосистем. Это является актуальной проблемой для экологического состояния Балтийского моря, которое характеризуется большим объемом впадающей речной воды, что делает его менее соленым по сравнению с другими морями. Микробное сообщество Балтийского моря – это уникальная комбинация морских и пресноводных микробных популяций, специфичных для данной акватории.

Целью данного исследования являлось изучение биodeградативного потенциала бактериопланктона Балтийского моря в модельных лабораторных системах (микроскомах).

Нефтеокисляющую активность штаммов–деструкторов углеводородов нефти и микробных сообществ воды и седиментов Финского залива изучали в пяти микроскомах, для моделирования наиболее приближенного к реальности сценария событий, связанных с внезапным разливом нефти в акватории Балтийского моря. Каждая модельная система состояла из пробы воды (отобранной в летний или зимний периоды), пробы седиментов (отобранной в летний или зимний периоды) и нефти. Для оценки биodeградативной активности выделенных в ходе работы микроорганизмов, в три системы вносили микроорганизмы–деструкторы ароматических и алифатических соединений, выделенные методом накопительных культур и прямым высевом из проб воды и седиментов Балтийского моря.

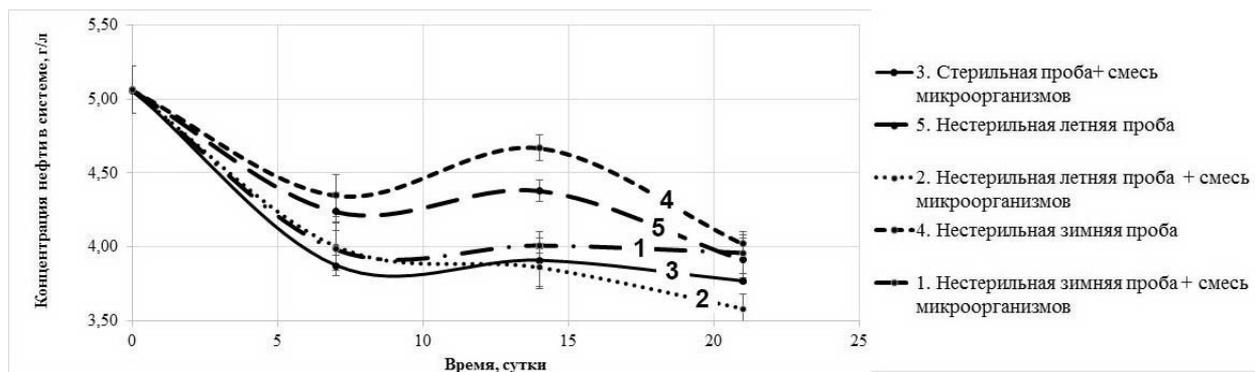


Рис. 1. Динамика остаточной концентрации нефти в системах

На рисунке 1 представлены данные по динамике остаточной концентрации нефти в системах в течение 21 суток эксперимента. Наибольшая скорость убыли нефти выявлена во всех системах в первые семь суток. Сходная динамика изменения концентрации нефти наблюдалась для микрокосмов 1, 2 и 3 с внесенными микроорганизмами в течение 21 суток. Убыль нефти в этих системах была выше по сравнению с микрокосмами 4 и 5, содержащими только аборигенные микроорганизмы–деструкторы.

Для численной оценки метаболической активности мы ввели понятие «коэффициент относительной нефтеокисляющей активности», где метаболическая активность выражается через отношение изменения количества нефти к изменению числа КОЕ за определенный период времени:

$$Q_n = \frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt}$$

где X – относительное изменение числа КОЕ за определенный период времени, %

$$X = \frac{X_{t1} - X_{t0}}{X_{t1}} \times 100\%$$

dS – изменение концентрации субстрата за определенный период времени, %

dt – определенный период времени, час

Таблица 1

Коэффициент относительной нефтеокисляющей активности и относительное изменение числа КОЕ нефтедеструкторов за определенный период времени

Модельная система	Относительное изменение числа КОЕ, %			Коэффициент относительной нефтеокисляющей активности углеводородокисляющих микроорганизмов, ч ⁻¹		
	7 – 14 сутки	14 – 21 сутки	7 – 21 сутки	7 – 14 сутки	14 – 21 сутки	7 – 21 сутки
1	86,18	40,29	91,75	0,007	0,015	0,003
2	88,21	37,78	92,67	0,007	0,015	0,003
3	95,62	-98,82	91,29	0,006	-0,006	0,003
4	38,10	6,07	41,85	0,017	0,084	0,007
5	88,15	73,29	96,84	0,007	0,007	0,003

Наибольшие значения относительного изменения числа КОЕ во всех микрокосмах выявлены в период с 7 по 14 сутки. Подсчитанные значения коэффициента относительной нефтеокисляющей активности микроорганизмов для микрокосмов 1, 2, 3 и 5 были весьма близки (табл. 1). Несмотря на то, что убыль углеводов нефти в микрокосме 4 была меньше, чем в системах 2, 3 и 5, коэффициент относительной нефтеокисляющей активности для него был выше остальных на всех стадиях эксперимента. Обе летние пробы характеризуются максимальной убылью нефти (рис. 1), однако зимняя проба без внесенных в нее микроорганизмов-деструкторов достигает наибольшей относительной нефтеокисляющей активности микроорганизмов к 21 суткам эксперимента за счет наибольшего относительного потребления углеводов нефти на микробную единицу. Таким образом, при оценке процесса биodeградации нефти в морских экосистемах следует учитывать как изменение концентрации углеводов, так и относительную метаболическую активность микробных штаммов.

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

Биоинформатический поиск генов, участвующих в деградации нафталина и салицилата в штаммах рода *Pseudomonas*

Фунтикова Т. В. Филатова И.Ю., Захарова М.В.

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

В настоящее время у микроорганизмов исследованы два биохимических пути деградации салицилата: либо через образование катехола с дальнейшей трансформацией по мета-пути (*nahHIJKLNM*) или по орто-пути (*catABCD*), либо – гентизата (*nagAaGHAbILK*). Ключевым ферментом, который осуществляет стехиометрическую трансформацию салицилата в катехол в присутствии кислорода и НАД(Н), является салицилатгидроксилаза (салицилат 1-монооксигеназа, NahG). Впервые фермент, названный авторами «салицилатгидроксилаза», был выделен и частично очищен Katagiri с соавторами при исследовании механизма ферментативного гидроксилирования ароматических соединений из почвенного штамма, впоследствии определенного *Pseudomonas* sp.. Среди *Pseudomonas* spp. наиболее часто встречаются гены *nahABCDEFG* (*nah1*) и *nahGHIJKLNM* (*nah2*), зачастую организованные в два отдельных оперона.

Большинство описанных к настоящему времени генов деградации нафталина и салицилата *Pseudomonas* spp. обладают высокой степенью гомологии (около 90%) с *nah*-генами архетипической плазмиды NAH7. Поэтому, обычно их называют «классическими *nah*-подобными генами». «Классические» опероны катаболизма нафталина и салицилата находятся под позитивным контролем единственного транскрипционного регулятора LysR-семейства (LTTR) - белка NahR, который активирует транскрипцию данных оперонов в присутствии салицилата. Ген *nahR*, кодирующий регуляторный белок, находится рядом с *nah2*-опероном.

По мере аннотирования новых штаммов микроорганизмов рода *Pseudomonas* стало ясно, что не все гены биохимического пути деградации нафталина (и салицилата) имеют структурную организацию, схожую с «классической». Анализ литературных данных показал, что генетическая организация оперонов деградации нафталина штаммов *P. putida* NCIB 9816-4 (pDTG1), *Pseudomonas* sp. ND6 (pND6-1), *P. stutzeri* AN10 отличается от данной схемы. Целью данной работы было определение генетической организации генов деградации нафталина (и салицилата) 17 полностью секвенированных и аннотированных

на настоящий момент геномов микроорганизмов рода *Pseudomonas*. Было сделано допущение, что присутствие гена *nahA* указывает на наличие *nahI*-оперона, *nahH* – оперона деградации катехола по мета-пути, *catA* – оперона деградации катехола по орто-пути. Также был произведен поиск генов, кодирующих салицилатгидроксилазы: классическую *nahG*, КТ-подобной *nahG1*, негомологичной «классической» *nahU*, и регуляторного гена *nahR*. Выравнивание нуклеотидной последовательности осуществлялось с помощью программы BioEdit и BLAST на сайте www.ncbi.nlm.nih.gov по генам, кодирующим аналогичные белки, штамма *P. putida* ND6 (гомологичные архетипической плазмиде NAH7) (табл.1).

Таблица 1

**Поиск генов, участвующих в деградации
нафталина и салицилата, гомологичных «классическим»**

<i>Pseudomonas putida</i>	<i>nahA</i>	<i>nahG</i>	<i>nahG1</i>	<i>nahU</i>	<i>nahR</i>	<i>nahH</i>	<i>catA</i>
KT2440			+				
B6-2		+				+	
BIRD-1			+				
F1			+				
GB-1			+		+		
HB3267							
JB			+				
NBRC14164							
S12			+				
S13.1.2							
S16							
SJTE-1		+	+			+	
W619			+				
DOT-T1E			+	+			+
pDLL-E4							
pPC2			+				
p1A00316							

Стоит отметить, что у всех проанализированных штаммов отсутствует последовательность, гомологичная гену *nahA*. В 10 штаммах присутствует последовательность, гомологичная гену КТ-подобной салицилатгидроксилазы (*nahG1*), причем у штаммов *P. putida* SJTE-1 и *P. putida* DOT-T1E обнаружена также последовательность, гомологичная иным салицилатгидроксилазам (*nahG* и *nahU* соответственно). Последовательность, гомологичная регуляторному гену *nahR* обнаружена только в штамме *P. putida* GB-1. В двух штаммах *P. putida* B6-2 и *P. putida* SJTE-1 наблюдалась последовательность, гомологичная гену *nahH*. Штамм *P. putida* DOT-T1E содержал последовательность, гомологичную гену *catA*.

В штамме *P. putida* B6-2 последовательности генов, гомологичные генам *nahG* и *nahH* расположены на расстоянии 1 т.п.н., сами гены расположены сонаправлено. В штамме *P. putida* SJTE-1 последовательности генов, гомологичные генам *nahG* и *nahH* расположены на расстоянии 1 т.п.н., сами гены расположены дивергентно, помимо этого на расстоянии 1 млн.п.н. обнаружена последовательность, гомологичная последовательности гена *nahG1*. В штамме *P. putida* DOT-T1E последовательности генов, гомологичные генам *nahU* и *catA* расположены на расстоянии 1 т.п.н. сами гены расположены сонаправлено, помимо этого на расстоянии 500 т.п.н. обнаружена

последовательность, гомологичная последовательности гена *nahG1*. Проанализировав полученные данные, предполагаем, что обнаруженные последовательности генов могут не быть организованы в один оперон в отличие от «классической» схемы организации. В штамме *P. putida* GB-1 последовательности генов, гомологичные генам *nahG1* и *nahR* расположены на расстоянии 10 т.п.н., сами гены расположены дивергентно. Такое расстояние между предполагаемыми регуляторным геном и геном салицилатгидроксилазы также отличается от «классической» схемы организации, в которой регуляторные области аналогичных генов перекрываются между собой.

Анализ полностью секвенированных и аннотированных на настоящий момент геномов микроорганизмов рода *Pseudomonas* показал, что последовательности генов, гомологичные «классическим» не организованы схожим образом с «классической» схемой генетической организации генов деградации нафталина и салицилата. Однако в указанных штаммах могут присутствовать гены негомологичные «классическим», поэтому требуются дальнейшие исследования с использованием иных инструментов для биоинформатического анализа.

Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти: свойства и перспективы

Делеган Я.А., Филонов А.Е.

Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

В настоящее время нефть остается одним из основных загрязнителей окружающей среды. Среди известных методов восстановления нефтезагрязненных грунтов и водных систем наиболее безопасным для окружающей среды является биоремедиация – применение микроорганизмов для утилизации углеводов. На рынке России и стран СНГ представлен ряд препаратов для деструкции нефти в условиях умеренного и холодного климата. Однако поиск оптимального подхода для решения проблемы нефтяного загрязнения в жарком климате в настоящее время продолжается.

В условиях жаркого аридного климата с резкими суточными перепадами температур наиболее перспективными агентами ремедиации являются термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы. Целью работы являлось исследование особенностей деструкции углеводов нефти термотолерантными бактериями, физиологических и метаболических свойств этих бактерий, разработка консорциума штаммов, способного эффективно деградировать нефть при температурах до 50°C в засоленных водах и грунтах с низкой влажностью (10%). Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить термотолерантные бактерии из природных образцов, исследовать их способность к росту на углеводородах, определить физиологические пределы выживаемости. Идентифицировать штаммы.

2. Отобрать эффективные термотолерантные штаммы, утилизирующие нефть как при умеренной (24°C), так и при повышенной (45-50°C) температурах, при различных концентрациях нефти и соли в среде. Исследовать способность бактерий продуцировать поверхностно-активные вещества.

3. Определить локализацию ключевых генов деструкции углеводов в эффективных штаммах-деструкторах.

4. Составить консорциум термотолерантных штаммов как основу биопрепарата для очистки грунтовых и водных экосистем от нефти в условиях жаркого аридного климата.

5. Определить эффективность деструкции нефти консорциумом в грунтовых и водных системах, моделирующих жаркий аридный климат.

Путем исследования зависимости удельной скорости роста от температуры было выявлено, что оптимальный рост термотолерантных бактерий осуществляется при температурах 35-37°C. Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК и анализ полученных последовательностей показали, что выделенные в данной работе 13 термотолерантных штаммов являются представителями родов *Gordonia* (штаммы 1В, 1D и 1G), *Rhodococcus* (4D, 6E, Par2, Par5, Par6, Par7, Par10, Par14, Par18) и *Paenibacillus* (12В). Исследуемые термотолерантные штаммы способны утилизировать нефть, дизельное топливо, отдельные углеводороды, в том числе в присутствии соли (до 10%).

Были отобраны наиболее эффективные термотолерантные деструкторы нефти: *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Deinococcus* sp. A2-6, *Gordonia* sp. 1G, *Rhodococcus* sp. Par6. На основании данных о субстратной специфичности штаммов, галотолерантности и способности продуцировать биоПАВ из отобранных 6 штаммов было составлено 4 различных консорциума (Табл. 1).

Таблица 1

Варианты консорциумов термотолерантных бактерий

Консорциум А	Консорциум Б	Консорциум В	Консорциум Г
<i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp. 1G <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6 <i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 <i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 <i>Gordonia</i> sp.1D

Для изучения деструкции нефти консорциумов бактерий культивировали в жидкой минеральной среде с 2% нефти и 3% соли в течение 14 суток. Консорциум В утилизировал 69% нефти при 24°C и 40% нефти при 45°C за вычетом абиотической убыли. Для сравнения эффективности консорциума В и монокультур в грунте в условиях жаркого аридного климата были смоделированы песчаные системы со следующими условиями: нефти – 2%, морской соли – 3%, влажности – 10%. Эксперимент проводили в течение 21 суток как при 24°C, так и при 45°C.

Штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU обладает набором генов деструкции нафталина *nar*. У штамма L5A-BSU отмечали нестабильность генов *nar* и признака деструкции нафталина. Тем не менее, в штамме не было обнаружено плазмид. Секвенирование генов *narAa*, *narAb*, *narB* показало, что последовательности имеют значительное сходство с последовательностями расположенных на плазмиде генов *R. opacus*. Сделано предположение, что эти гены были в процессе горизонтального переноса приобретены в составе МГЭ (возможно, транспозоноподобной структуры) от *R. opacus*.

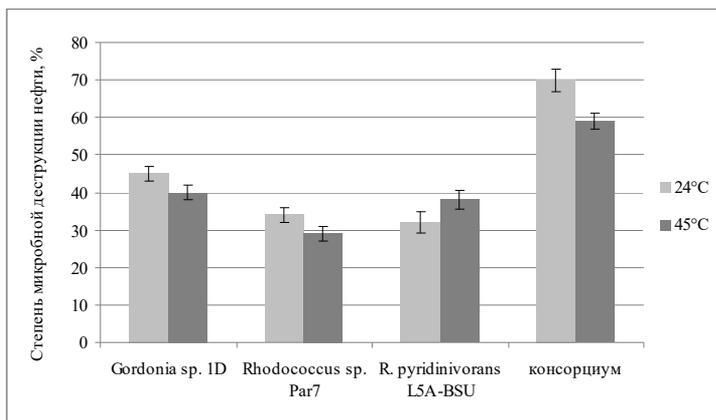


Рис. 6. Степень деструкции нефти штаммами 1D, Par7, L5A-BSU и консорциумом трех штаммов в грунте с 2% нефти, 3% соли и влажностью 10% при 24°C и 45°C. Время эксперимента – 21 сутки

Выводы

1. У 18 термотолерантных культур проанализирована способность утилизировать углеводороды при температурах до 50°C. Штаммы были идентифицированы как представители родов *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus* и *Deinococcus*.

2. Наиболее эффективные термотолерантные деструкторы – *Gordonia* sp. 1D, *Gordonia* sp. 1G, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Rhodococcus* sp. Par6, *Deinococcus* sp. A2-6 – утилизировали нефть как при 24°C, так и при 45°C, в присутствии нефти до 10% и соли до 7%.

3. Все исследуемые штаммы *Gordonia* продуцировали внеклеточные биоПАВ (гликолипидные смеси). При культивировании при различных температурах смеси отличались по составу, однако обладали одинаковой поверхностной и эмульгирующей активностью.

4. Проанализированы последовательности фрагментов генов алкан гидроксилаз *alkB* и *CYP153* в штамме *Gordonia* sp. 1D. Отсутствие изменений в спектрах окисляемых штаммом субстратов позволяет предположить, что оба фермента активны как при умеренных, так и при повышенных (45-50°C) температурах.

5. Гены деструкции нафталина *nar* в штамме *R. pyridinivorans* L5A-BSU предположительно находятся в составе мобильного генетического элемента в хромосоме штамма. Был осуществлен перенос МГЭ в штамм *R. erythropolis* Par7, получены Nah^+ рекомбинанты.

6. Составлен консорциум штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, способный утилизировать нефть и нефтепродукты в грунтах и водах при температурах 20-50°C, уровне загрязнения нефтью до 10%, при влажности грунта около 10%. Показана эффективность консорциума штаммов в условиях, моделирующих жаркий аридный климат.

7.

Работа выполнена при поддержке РФФИ Бел_а № 16-54-00200.

Обнаружен конститутивный промотор оперона деградации салицилата

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

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² ФГБОУ ВО ТулГУ

Салициловая кислота (СК) и ее соли, салицилаты, широко распространены в природе и являются важным участником метаболизма животных, растений и бактерий. Наряду с пероксидом водорода, оксидом азота и другими метаболитами салициловая кислота является участником функционирования некоторых сигнальных систем: НАДФН – оксидазной (может выступать в роли ингибитора активности каталазы), NO – синтазной (является посредником между NO и геномом, способствуя NO – индуцированному салицилатзависимому синтезу мРНК белка PR1), MAP – киназной (индуцирует синтез специальной изоформы MAP – киназы SIPK, которая через фактор регуляции транскрипции воздействует на геном). Отмечена способность салициловой кислоты индуцировать системную приобретенную устойчивость растений к разнообразным возбудителям болезней, т.е. выступать в качестве аналога фитогормонов [Shunping and Xinnian, 2014]. Салицилат является предшественником сидерофоров, низкомолекулярных хелаторов железа, у некоторых бактериальных родов, таких как *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Vibrio*, *Yersinia* и *Mycobacterium*. Сидерофоры, продуцируются микроорганизмами в ответ на недостаток железа, секретирясь в окружающую среду, и способны преобразовать нерастворимые полимеры гидроксида железа (III) в растворимые комплексы, которые усваиваются через специфические рецепторы на поверхности клеток. У прокариот салицилат-ион является ключевым интермедиатом в биодеградациии нафталина, фенантрена, антрацена и некоторых других поллютантов, в то же время обладает способностью индуцировать гены деградации этих токсичных соединений. При этом накопление салицилатов в среде может подавлять рост микроорганизмов. Перечисленные выше данные однозначно указывают на необходимость присутствия салицилат-ионов в постоянной, контролируемой концентрации (использования данного вещества для нужд клетки, при этом предотвращая «незапланированную» экспрессию ряда генов деградации ароматических соединений), что напрямую должно быть связано с механизмом тонкой регуляции экспрессии генов деградации салицилата.

Объектом исследования в данной работе является оперон деградации салицилата *sgp* (*salicylate-gentisate pathway*) штамма *Pseudomonas putida* AK5. Продукты генов *sgp*-оперона отвечают за менее охарактеризованный путь деградации салицилата через гентизат [Izmalkova et al, 2013]. Для исследования регуляторной области *sgp*-оперона был проведен ряд экспериментов *in vitro* и *in vivo*, позволяющих охарактеризовать некоторые важные детали экспрессии генов оперона на этапе транскрипции. Методом транскрипции *in vitro* определили стартовую точку транскрипции синтеза мРНК. В эксперименте были использованы РНК-полимеразы предварительно очищен *E.coli* и *P.putida*, результаты экспериментов с применением различных полимераз были аналогичны друг другу.

Наблюдается образование трех транскриптов, один из которых (верхняя полоса, транскрипт 1) синтезируется с промотора гена *sgpR*, а другие (две нижних полосы, транскрипт 2 и 3 соответственно) синтезируются с промоторов *sgp*-оперона. Важно отметить, что ранее для генов деградации салицилата отмечалось наличие одного, индуцибельного, промотора. Результаты данного эксперимента указывают на наличие двух близко-расположенных промоторов.

Нуклеотидная последовательность была размечена в системе координат, за начало которой (+1) была принята точка начала транскрипции, определенная методом 5'RACE-PCR для *sgp*-оперона в условиях индукции салицилатом. Транскрипт 1 относится к регуляторному гену *sgpR*, +1 точка которого располагается в координатах от -27 до -53 н.. Для транскрипта 2 точка начала транскрипции располагается в диапазоне от +1 до +23 п.н., для транскрипта 3 в диапазоне от +21 до +43 п.н. Для одного из транскриптов (2) +1 точка, локализованная ранее экспериментально совпала с данными, полученными в ходе этого эксперимента.

В условиях данного эксперимента для образования транскриптов *sgp*-оперона не требуется наличие салицилата. Это может быть связано с суперскрученностью ДНК, что накладывает определенные ограничения на активность промоторов в отсутствии индуктора.

С использованием штамма *E.coli* Z85, вектора pQE30/*sgpR* и химерных конструкций *sgp::lacZ* на основе плазмиды p184, было произведено картирование промоторной области *sgp*-оперона. Уровень экспрессии β -галактозидазы в конструкции *sgp(-85/+58)::lacZ* (содержащей полноразмерный фрагмент промоторной области) в отсутствии салицилата сравним с уровнем экспрессии в беспромоторном векторе p184 (отрицательный контроль). В присутствии салицилата отмечено увеличение активности LacZ в ~ 5 раз. В конструкции *sgp(-5/+58)::lacZ* (содержащей усеченный $P_{sgp.ind}$) наблюдается появление слабой (~ 2 раза выше отрицательного контроля) конститутивной экспрессии гена *lacZ*. Определение общего уровня транскрипции с промоторов генов оперона *sgpA/K/G/H/B* указанных химерных конструкций было выполнено при помощи обратной транскрипции и ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени. Для этого из клеток *E.coli* Z85, культивируемых, как в присутствии, так и в отсутствии салицилата натрия, выделяли тотальную РНК. Полученную при помощи специфичных праймеров кДНК использовали в качестве матрицы для проведения real-time PCR. Уровень транскрипции с промоторов генов *sgp*-оперона определяли по значениям порогового цикла (Cp). Вычисление уровней транскрипции проводилось с учетом того, что концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N – количество циклов амплификации. В качестве контрольного выбран ген резистентности к хлорамфениколу (маркерный ген плазмиды p184). Были получены результаты указывающие на то, что экспрессия гена *lacZ* в конструкции *sgp(-85/+58)::lacZ* в присутствии индуктора увеличивается в ~ 2 раза, в то время как при усечении $P_{sgp.ind}$ в конструкции *sgp(-5/+58)::lacZ* подобного увеличения в условиях индукции не происходит.

Конститутивный промотор, расположенный downstream индуцибельного промотора, оперонов деградации салицилата может принимать участие в поддержании концентрации данного соединения на постоянном уровне, не приводящем к индукции иных оперонов. Данный регуляторный элемент для генов деградации салицилата обнаружен впервые, что может стать ключевым дополнением в общем механизме регуляции экспрессии генов с участием этого соединения.

Генетическая характеристика изолятов *Enterococcus faecalis* выделенных у детей при инфекциях мочевыделительной системы в Приморском крае

Коменкова Т.С.², Шадрин А.М.¹, Зайцева Е.А.²

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Владивосток (Кафедра микробиологии и вирусологии)

Инфекционно-воспалительные заболевания мочевой системы у детей являются одной из актуальных проблем педиатрии и характеризуются этиологической мультифакторностью. В течение длительного времени общепризнанными возбудителями уроинфекций являются энтеробактерии, среди которых доминирует *Escherichia coli*. Частота встречаемости *Enterococcus faecalis* как этиологического фактора инфекций мочеполовой системы (ИМС) по данным ESGNI (European Study Group on Nosocomial Infection) составляет 15.8%, а Научного центра здоровья детей РАМН – 14.2% [1]. В Приморском крае, по данным Краевой детской клинической больницы № 1 (Владивосток) за 2008 – 2013 годы лидирующую позицию в этиологии инфекции мочевой системы (ИМС) занимали изоляты *E. faecalis*. Так, в период с 2008 по 2013 годы частота *E. faecalis* при ИМС варьировала от 53% до 75% [2]. Способность энтерококков инициировать инфекционный процесс обусловлена наличием у них генов факторов патогенности: цитолизин, адгезин, феромон, генов устойчивости к антибиотикам и др. Истинное этиологическое значение этих микроорганизмов, в развитии тяжелого течения инфекционного процесса и его неблагоприятных исходов, остается неопределенным до настоящего времени из-за изменчивости энтерококков. В тоже время, без учета патогенного потенциала невозможно оценить клинико-эпидемиологическое значение того или иного штамма.

Целью данной работы было генотипирование и тестирование наличия генов факторов патогенности у изолятов *Enterococcus faecalis*, выделенных у детей при инфекциях мочевыделительной системы в Приморском крае Дальневосточного региона России.

Объектом данного исследования была коллекция из 17 изолятов *E. faecalis*, выделенные в период с 2013 по 2016 годы в краевой детской клинической больнице №1 г. Владивостока у детей в возрасте от трех дней до четырнадцати лет с ИМС.

Для тестирования наличия генов использовалась ПЦР со специфическими праймерами. Все изоляты содержали два и более из шести тестируемых факторов патогенности. 8 изолятов (47%) содержали четыре фактора патогенности, 4 изолята – пять (23,5%) генов факторов патогенности и 4 (23,5%) изолята содержали все исследуемые гены факторов патогенности. Известно, что количество детектируемых генов факторов патогенности коррелирует с вирулентностью штаммов [3]. Частота встречаемости генов факторов патогенности в дальневосточных клинических изолятах выше, чем в коллекциях клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных из мочи, описанных другими исследователями. Так, например, ген *aggA* встречался в 2 раза чаще, чем в коллекциях из Болгарии [4], Бразилии [5], но сопоставим с частотой встречаемости в изолятах из Чили [6]. С другой стороны, частота встречаемости генов *eep*, *esp*, *efaA* и *gelA* в чилийских изолятах была ниже в 1.4, 1.4, 1.6 и 2.7 раза соответственно. Частота встречаемости генов *cyfA*, *esp* и *gelE* была сопоставима с частотой встречаемости, описанной для штаммов, выделенных в Окайама University Hospital (Япония) [7].

Для генотипирования изолятов использовали метод мультилокусного типирования (MLST) [8]. Секвенирование каждого ПЦР продукта, соответствующему локусу, проводили в двух различных направлениях. Кластерный анализ результатов

мультилокусного типирования осуществляли с помощью программы BioNumerics software (version 7.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Генотипирование было проведено для семи случайным образом выбранных изолятов *E. faecalis*.

По результатам мультилокусного типирования семь протестированных изолятов принадлежали к пяти ранее выявленным сиквенс-типам. Были выявлены сиквенс-типы ST6, ST16, ST40, ST41, ST179. С помощью метода кластерного анализа полученные результаты были сопоставлены с базой данных MLST (<http://efaecalis.mlst.net/misc/info.asp>), содержащей данные о более чем 1200 изолятах *E. faecalis*. Пять сиквенс-типов изолятов энтерококков были распределены в четыре различных клональных комплекса. Это свидетельствует о присутствии на территории Приморского края как минимум нескольких суб-популяций штаммов с различным количеством генов факторов патогенности. Для сиквенс типов ST6 и ST179 было определено по два изолята, выделенные в разные годы. Оба изолята ST179 сиквенс-типа несли 5-6 генов факторов патогенности и обладали гемолитической активностью α - или β -типа. Среди сиквенс-типов, определенных нами, наиболее распространёнными в мире являются ST6 (107 (8.9%) загрузок в базу данных), ST16 (57 (4.7%) загрузок в базу данных) и ST40 (40 (3.3%) загрузок в базу данных). Так, ST6 был обнаружен в 12 странах мира: в Испании, США, Португалии, Польше, Норвегии, Кубе, Нидерландах, Франции, Нигерии, Японии, Испании, Малайзии. Чаще всего это были клинические изоляты, полученные от госпитализированных пациентов, однако, в Нигерии данный ST6 был выделен из фекалий животных (свиней). Интересный факт, что энтерококки ST40 были выделены из сыра во Франции.

Суммируя полученные результаты можно заключить, что для детального понимания этиопатогенеза ИМС, необходимо дальнейшее, более обширное, исследование, направленное как на анализ наличия генов факторов патогенности, так и на выявление особенностей функциональной активности и регуляции факторов патогенности у клинических изолятов *E. faecalis*.

Список литературы

1. Чащина И.Л., Таточенко В.К., Баркадзе М.Д. Место цефалоспоринов в терапии инфекций мочевыводящих путей у детей. Вопросы современной педиатрии 2012; 11 (1): 158-161
2. Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Зайцева Е.А., Семешина О.В. Структура и антибиотикорезистентность уропатогенов, выделенных у новорожденных с инфекцией мочевых путей. Практическая медицина. 2015. № 2-2 (87). С. 97-100.
3. *Enterococci*. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. 2014. Editor-in-chief Michael S Gilmore. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 493 p.
4. Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis*. 2016 Mar-Apr; 20 (2):127-33.
5. Bittencourt de Marques E, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol*. 2004 Nov; 53 (Pt 11): 1069-73.
6. Padilla C, Lobos O. Virulence, bacterocin genes and antibacterial susceptibility in *Enterococcus faecalis* strains isolated from water wells for human consumption. *Springerplus*. 2013 Dec; 2 (1): 43.
7. Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*. 2005 Jun; 59 (3): 79-87.
8. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Murray BE, del Campo R, Willems RJ. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun; 44 (6): 2220-8.

**Взаимное влияние элементов крови и гемолизина II:
связь экспрессии гемолизина II и чувствительности
клеток в крови различных млекопитающих**

**Ковалевская Ж.И.¹, Бударина Ж.И.¹, Сиунов А.В.¹, Нагель А.С.¹,
Шадрин А.М.¹, ¹Винокуров М.Г.², Солонин А.С.¹**

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² Институт биофизики клетки РАН

Бактериальные клетки при попадании в русло крови млекопитающих должны обеспечивать себя питательными веществами. Основным инструментом бактерий, широко используемым для этой цели, являются пороформируемые токсины, которые вводя в мембраны окружающих клеток поры нарушают их целостность и позволяют бактериальным клеткам использовать для питания различные питательные вещества. Основной пороформирующий белок *Bacillus cereus* гемолизин II способен преодолевать гликокализ эукариотных клеток и в связи с этим выяснение его поведения при попадании в русло крови, включающее способность атаки основных элементов крови и зависимость эффективности синтеза HlyII бактериями является актуальной задачей в анализе роли этого токсина в процессе патогенеза. Для экспериментов была взята кровь, а также взвесь эритроцитов и плазма крови человека. С помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии при использовании флуоресцентных красителей пропидия иодида (PI) и Hoechst-33258, мы изучили влияние HlyII на нейтрофилы, выделенные из крови и макрофаги. В ходе этих экспериментов показано, что при атаке клеток гемолизином наблюдается их гибель, которая при высоких концентрациях гемолизина II идет по пути некроза, при более низких наблюдали что гибель может идти и по пути программируемой клеточной смерти (апоптоза). Аналогичные результаты были получены при использовании эритроцитов - основного элемента крови. При анализе воздействия гемолизина на эритроциты различных млекопитающих продемонстрирована заметная разница в чувствительности этих элементов в зависимости от их происхождения. Ранее сконструированные штаммы *B. subtilis* и *B. cereus*, содержащие транскрипционно слитый с промотором гена гемолизина II ген β -галактозидазы, находящийся на плазмиде, трансформируемой в бациллярные клетки, позволили быстро определять зависимость эффективности экспрессии гена гемолизина II от состава среды выращивания. Эксперименты по тестированию непосредственно гемолитической активности при выращивании рекомбинантных *B. subtilis* с геном гемолизина II и *B. cereus* в среде, содержащей компоненты крови показали понижение гемолитической активности из-за пермеабиллизации HlyII мембран клеток крови. Выращивание *B. subtilis* с репортерным геном, расположенным вслед за промотором гена гемолизина на средах с добавлением компонентов крови и без них, не дало никаких заметных отличий. Штаммы *B. cereus* выращивали на разных средах с компонентами крови человека, на среде LB, и на специальной среде для бацилл ВНИ. Результаты анализа эффективности транскрипции с промотора гена *hlyII* позволяет прийти к заключению, что плазма крови человека содержит индуктор, что подтверждается различием уровня экспрессии репортерного гена β -галактозидазы в плазме и без неё. Использование плазмы крови различных млекопитающих в среде выращивания позволило обнаружить различия в эффективности экспрессии гена гемолизина II в зависимости от происхождения. Все исследованные плазмы крови обеспечивают индукцию HlyII. Выявлено различие между эффективностью воздействия, которая включает уровень индукции HlyII и чувствительность эритроцитов к этому токсину, у различных животных - при высокой чувствительности клеток к

гемолизину II наблюдается снижение индукции этого токсина. По всей вероятности такая связь имеет биологический смысл. Результаты проводимых работ помогут создать детальную картину изменений, происходящих в различных органах и тканях млекопитающих при попадании в их организм данного токсина (как в виде очищенного препарата, так и при инфекции бактериями, его продуцирующими).

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

Роль компонентов плазмы крови человека в индукции синтеза токсина hlyII в клетках *V. cereus*

**Ковалевская Ж.И., Саламов В.И., Сиунов А.В., Шадрин А.М., Нагель А.С.,
Холод Н.С., Бударина Ж.И., Глазунова О.А., Солонин А.С.**

Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

V. cereus - широко распространенный патоген, который вызывает пищевые отравления с диарейным и эметическим синдромами, а также заболевания глаз, нервной системы, маститы, сепсис, пневмонию, эндокардит, менингит, энцефалит и другие болезни у человека. *V. cereus* синтезирует ряд токсинов, которые способствуют развитию инфекции. Гемолизин II (HlyII) является одним из основных факторов патогенности *V. cereus*. HlyII является порообразующим цитолитическим токсином. HlyII разрушает клетки эукариот путем формирования ионопроводящих нанопор в их мембранах, что приводит к лизису клеток, некрозу или апоптозу. Продукция бактериальных токсинов регулируется на транскрипционном уровне. Экспрессия *hlyII* контролируется несколькими транскрипционными факторами, которые репрессируют экспрессию гена токсина. Однако не много известно о том, как активируется экспрессия *hlyII*. Выращивание *V. cereus* в среде, в которую добавлена кровь человека, приводит к увеличению общей гемолитической активности примерно в 10 раз. Использование бацилл с репортерным геном бетагалактозидазы под контролем *hlyII* промотора и ПЦР в режиме реального времени показало, что экспрессия гена *hlyII* увеличивается в 100 раз в присутствии в культуральной среде плазмы крови человека. При выращивании рекомбинантного штамма *V. cereus*, нокаутированного по гену регулятора *hlyIIR*, экспрессия гемолизина II была сравнима с экспрессией в диком штамме *V. cereus*, выращенном на среде с плазмой. Из полученных результатов следует, что плазма содержит индуктор, который может взаимодействовать с HlyIIR напрямую или может запускать механизм внутри клетки, приводящий к изменению его способности связываться с оператором, и репрессор уже не может блокировать транскрипцию *hlyII*. Таким образом, попадая в макроорганизм, бактерии значительно увеличивают экспрессию гена *hlyII*, продукт которого вызывает лизис клеток, что обеспечивает бактериальные клетки питательными веществами. Обработка плазмы крови протеиназой К приводило к существенному падению её индуцирующей способности. Фракционирования плазмы крови с целью обнаружения индуктора привели к получению фракций, проявляющих эффект индукции *hlyII*, которые по результатам масс-спектрометрии содержат сывороточный альбумин человека. Ранее с помощью рентгеноструктурного анализа показано, что транскрипционный регулятор HlyIIR содержит структурный карман, который способен вместить в себя гидрофобные молекулы размером в районе 400 дальтон. Показано, что альбумин как белок не является активатором *hlyII*, а, по-видимому, участвует в переносе индуктора, так как известно, что альбумин является переносчиком различных веществ в кровяном русле. Изучение

механизмов регуляции экспрессии микробных токсинов является чрезвычайно важным для понимания основ инфекционного процесса и необходимым для разработки эффективных способов борьбы с инфекциями, вызываемыми бактериями и для подавления заболеваний макроорганизмов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №15-34-20940 мол_a_вед.

Процессинг и активация прокаспазы-3 протеазой S273R вируса африканской чумы свиней

**Зражаева Д.С.^{1,2}, Латыпов О.Р.¹, Майоров С.Г.¹, Третьяков К.К.¹,
Холод Н.С.¹, Грановский И.Э.¹**

¹ Лаборатория энзимологии генетических процессов ИБФМ РАН

² Пуштинский государственный естественно-научный институт

Вирус африканской чумы свиней является одним из наиболее опасных патогенов, для которого отсутствуют эффективные средства профилактики и лечения. Он обладает эффективными механизмами, позволяющими ему уклоняться от защитных систем организма. Данное исследование проводится в рамках проекта по разработке молекулярного механизма устойчивости свиней к вирусу АЧС, который основан на инициации апоптоза на ранней стадии инфекции и последующей блокировке репликации вируса на клеточном уровне. Ключевым моментом в запуске апоптоза является активация эффекторной каспазы-3, после чего процесс становится необратимым. Каспаза-3 синтезируется в клетке в виде линейного предшественника - прокаспазы, и для ее активации необходим ограниченный протеолиз инициаторными каспазами, в результате чего удаляется лидерный N-концевой пептид и линкер, соединяющий две субъединицы. В разрабатываемом подходе функцию инициаторных каспаз будет выполнять протеаза S273R вируса АЧС за счет введения ее сайта в последовательность прокаспазы-3. Протеаза S273R необходима для эффективного прохождения начальных стадий вирусной инфекции. Она осуществляет процессинг вирусных полибелков и входит в состав вириона.

В задачи данного исследования входило: замещение природного сайта процессинга прокаспазы-3 свиньи на сайт протеазы S273R вируса АЧС, получение очищенного препарата модифицированной прокаспазы-3 и изучение её процессинга и активации вирусной протеазой *in vitro*.

На начальном этапе работы нами была сконструирована модифицированная прокаспазы-3 свиньи, содержащая один из известных сайтов узнавания протеазы S273R между большой и малой субъединицами, и получен очищенный препарат профермента. Анализ показал, что модифицированная прокаспазы-3 процессируется протеазой S273R *in vitro*, но обладает низкой удельной активностью в сравнении с каспазой-3 дикого типа. Мы предположили, что снижение удельной активности модифицированной каспазы-3 обусловлено составом аминокислотной последовательности введенного сайта протеазы S273R. Исходя из этого, нами было сконструировано 4 варианта прокаспазы-3, содержащих другие сайты узнавания протеазы S273R, и проведен анализ их процессинга и активации. Процессинг полученных препаратов модифицированных прокаспаз происходил с разной степенью эффективности и не приводил к их активации.

В связи с этим мы изменили стратегию: сайт узнавания протеазы S273R вводили в линкер между большой и малой субъединицами прокаспазы-3 с сохранением природного

сайта процессинга. В результате нами были получены 4 варианта белка, содержащие различные сайты узнавания протеазы S273R. Как и в случае прокаспазы-3 дикого типа, их продукция в *E. coli* сопровождалась процессингом и активацией. Сравнительный анализ очищенных препаратов каспазы-3 дикого типа и её модифицированных вариантов показал, что они обладают сопоставимой удельной активностью. Поскольку полученные варианты каспазы-3 продуцировались в процессированном виде, оставался открытым вопрос: доступен ли для протеазы S273R сайт, введенный в междоменный линкер. Для ответа на него мы внесли замену в природный сайт процессинга между большой и малой субъединицами одного из вариантов модифицированной прокаспазы-3, которая нарушала её протеолитическое расщепление при продукции в *E. coli*. В экспериментах на очищенном препарате белка мы установили, что протеаза S273R эффективно расщепляет модифицированную прокаспазу-3 по сайту в междоменном линкере.

Проведенные нами исследования создают основу для дальнейшего изучения способности протеазы S273R вируса АЧС активировать модифицированную прокаспазу-3 и тем самым инициировать апоптоз в культуре клеток млекопитающих.

**Изучение бактериофаговой флоры европейских зубров
Bison bonasus (L, 1758) и американских бизонов Bison bison
(L, 1758) (Bovinae, Bovidae, Artiodactyla) Приокского–террасного
государственного заповедника**

Зимин А.А.^{1,4}, Никулин Н.А.^{1,2}, Землянко В.И.³

¹ Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

² Кафедра микробиологии, Биологический факультет, Вятского государственного университета, г. Киров

³ Приокский-террасный государственный заповедник, Данки, Моск. обл.

⁴ Пушчинский государственный естественно-научный институт

Summary. Zimin AA, Nikulin NA, Zemlyanko VI The study of bacteriophage flora of european bison *Bison bonasus* and the american bison *Bison bison* (Bovinae, Bovidae, Artiodactyla) of the Prioksky - Terraced State Reserve. Materials of the 3rd Pushchino School-Conference "Biochemistry, physiology and biosphere role of microorganisms," 5 - 9 December 2016, Pushchino, Moscow region, Russia. Fecal samples were taken from the European bison and American bison in the nursery of the Prioksky - Terraced State Reserve in Moscow region of the Russia. Extracts were prepared from fecal matter and determined titer of coliphages. Coliphage titer of most of animals was not more than 30 pfu per 1 ml. Only one young male bison titer was 10³ pfu. This animal looked healthy and showed no other signs of bacteriosis. Pseudomonas phage titer of most of animals was not more than 10⁷ pfu per 1 ml.

Введение. Зубр – редкое, исчезающее млекопитающее. Для биологической науки и практики сельского хозяйства, а также для оптимизации содержания самих зубров, существенно проводить регулярные исследования бактериофлоры и вирофлоры этих животных. Для сравнительного с другими полигастричными и моногастричными животными было бы интересным изучить бактериофаги в фекалиях зубров и содержащихся в таких же условиях бизонов. При исследовании вирофлоры зубров и бизонов авторы исследования предполагают обратить особое внимание на колифаги. То есть на бактериофаги кишечной палочки, существенного возбудителя диареи у диких и сельскохозяйственных животных. Практическим приложением данных исследований может быть получение новых противо-бактериозных препаратов, а также разработка

методов оценки здоровья быков на основе мониторинга их фаговой флоры. Выделение новых бактериофагов из фекалий зубров и бизонов может быть использовано также для создания лекарственных средств против бактериозов и у других таксономически близких к ним животных.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили пробы фекалий зубров и бизонов. Отбор проводился из различных мест обитания быков, начиная с загона для ослабленного молодняка, затем загон для содержания бизонов, после загон для содержания стада подросших животных. Пробы помещали в стерильные пробирки и оборачивали пробирки латексом, и транспортировали в лаборатории.. В тот же день производили получение экстрактов. 2 г фекалий быков суспендировали в 8 мл буфера. Далее перемешивали в орбитальном шейкере в течение 20 минут при 100 оборотах в минуту при комнатной температуре, делали аликвоты. Центрифугировали в течение 2 мин со скоростью 10000 оборотов в минуту, и использовали непосредственно после получения. К 5 мл суспензии фагов доливали глицерин до 50% (об/об) и хранили при -70°C. После обработки, проводился высеv фагов на штаммы *E.coli* C600, B и штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Для выращивания бактерий использовали среду LB. Для титрования фагов использовался метод Грация. Также проводилось выделение отдельных бляшек, их очистка путем пересевов. В большинстве проб фекалий зубров и бизонов титр фагов на штаммах B и C600 был от 10 до 150 бляшек на мл. Лишь в одном случае у здорового молодого самца зубра титр составлял 10³. Мы планируем исследовать причины столь сильно колебания титра у этих животных. Высеv на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 проводили через 3 месяца хранения при -70°C.



Рис. 1. Животные, у которых отбирали пробы. А – зубры первого года в отдельном загоне, Б – бизон, В – зубры-подростки в стаде для молодняка

Таблица 1. – титр фагов с фекалий зубров и бизонов. 1,4 – 2 зубра, фекалии принадлежат или молодой самке, или самцу, у которого была диарея после рождения, 2 – старые фекалии молодого зубра, самца, 3 – свежие фекалии молодого самца зубра, 5 – свежие фекалии взрослого самца бизона.

№ пробы	Титр		
	<i>E.coli</i> B	<i>E.coli</i> C600	PAO1
1	10	10	12±3
2	0	0	23±3
3	3,95*10 ²	1,28*10 ³	102±5
4	10	30	17±5
5	10	10	3±2

Обсуждение. Анализ ситуации с заболеваемостью зубров в ГПТЗ. В настоящее время заболеваемость зубров кишечными инфекциями стоит на низком уровне. В основном встречается два вида диарей. 1. Диарея, вызванная плохим вскармливанием молодых животных самками. 2. Диарея, вызванная переводом зубров с кормления зимними кормами на "зеленую траву", то есть на вскармливании на свободном выпасе. В эти периоды можно было бы применять препараты на основе бактериофагов против инфекций, связанных с нарушением микрофлоры при изменении питания.

Оценивая полученные данные, можно обратить внимание на низкий титр колифагов в фекалиях всех животных кроме одного. Наличие определенного низкого титра фагов псевдомонад у животных связано с питанием травой. При таком питании эта бактерия, обитающая в почве и на растениях (1-2), попадает в кишечный тракт быков.

Выводы. (1) Нами были получены титры бактериофаговых популяций из фекалий зубров и бизонов на таких штаммах *E.coli* как С600, В и штамме *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, (2) а также создана рабочая коллекция бактериофагов.

Заключение. Исследование дает возможность говорить о перспективах выделения из фекалий зубров и бизонов фагов для получения препаратов для профилактики и терапии этих животных в условиях питомника. Данные, которые можно получить из этих исследований, важны для заповедного дела и охраны редких млекопитающих, а также для разработки препаратов для борьбы с бактериозами сельскохозяйственных животных.

Благодарности. Авторы благодарят лаборанта Дручкову Ю.Н. за техническую помощь.

Список литературы

1. Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK, Vitanza-jack VB. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol.* 1974 Dec;28(6):987-91. PubMed PMID: 4217591; PubMed Central PMCID: PMC186868.
2. Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* 2004 Jan;134(1):320-31. PubMed PMID: 14701912; PubMed Central PMCID: PMC316311.

Бактериофаговая флора очистных сооружений города Пушино Московской области

Никулин Н.А.^{1,2}, Зимин А. А.^{2,3}

¹ Кафедра микробиологии, Биологический факультет, Вятского государственного университета, Киров, Россия

² Лаборатория молекулярной микробиологии ИБФМ РАН

³ Пушчинский государственный естественно-научный институт

Summary. Nikulin NA, Zimin AA, Bacteriophage flora of treatment plant of Pushchino Moscow region. Materials of the 3rd Pushchino School-Conference "Biochemistry, physiology and biosphere role of microorganisms," 5 - 9 December 2016, Pushchino, Moscow region, Russia. We received bacteriophage titers on various wastewater treatment stages and morphology of plaques on strains of *E.coli* C600, DH1, B, BL21, as well as a working collection of bacteriophages. It is shown that the bacteriophage titer varies from $2.21 \cdot 10^3$ to 0. As a result, our study provides the opportunity to talk about the prospect of an object such as waste water. Data that can be obtained from these studies are important for the environment study and bacteriophage microbiology.

Введение. Сточные воды являются источником огромного количества бактериофагов, как изученных, так и до сих пор не определенных. Этому способствует разнообразный субстрат для них в данном объекте. Бактериофаги влияют на экосистемы в значительной степени. Фаги, участвующие в процессе трансдукции, способны передавать различные гены бактерий (1). Особенно это важно в случае ферментов синтеза антибиотиков, токсинов, генов вирулентности (2). Литические бактериофаги способны сохранять энергию на одном уровне пищевой цепи, благодаря как остановке процессов синтеза метаболитов, так и собственно разрушению бактерий (3). Наличие у некоторых фагов неканонических оснований позволяет предположить нахождение новых взаимосвязей в системе вирус-клетка (4). В практическом плане, бактериофаги сточных вод могут являться индикатором изменения состояния систем водоочистки, в случае изменения титра – предупреждать о возможных эпидемиологических проблемах (5). Широкое разнообразие, позволяет обнаружить новые литические фаги, которые можно использовать в медицине и ветеринарии для терапии (6). Таким образом, наблюдая за бактериофагами сточных вод, можно получить данные, которые можно использовать в сферах экологии, эпидемиологии и бактериофагии, как с практической, так и научной сторон.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили пробы воды с очистных сооружений города Пушкино Московской области. Отбор проводился последовательно из различных мест системы очистки воды, начиная с вторичных отстойников, затем аэротенки, после первичные отстойники и, наконец, вход, по увеличению загрязненности. Помещенные в стерильные пробирки пробы, запечатанные в латекс, в стеклянном коробе отправлялись для дальнейшего изучения в лабораторию. Для начала проводилась обработка воды различными способами для очистки от посторонней микрофлоры. Первоначально использовался хлороформ, в соотношении 1:20 от исследуемой жидкости. Однако в данном случае возможна утрата некоторых фагов, чувствительных к нему, поэтому также был применен другой способ, а именно: первичное осаждение центрифугированием с режимом 10000 оборотов в минуту 3 мин., а затем фильтрование супернатанта мембранными фильтрами. После обработки, проводился высев фагов на штаммы *E.coli* C600, DH1, В, BL21. Для выращивания микроорганизмов использовалась питательная среда LB. Для высева фагов использовался метод Грация. Для начала были определены подходящие объемы пробы, достаточный для определения титра и сохранения биоразнообразия, ими оказались 100 и 1000 мл соответственно. На следующий день производились подсчет титра и морфологическая оценка бляшек. Также проводилось выделение отдельных бляшек, их очистка путем пересевов.

Результаты. По значениям титров было определена их незначительная вариация после прохождения первого этапа очистки относительно различных штаммов: $1,21 \cdot 10^3$ (BL21), $1,08 \cdot 10^3$ (В), $2,06 \cdot 10^3$ (с600), $2,21 \cdot 10^3$ (DH1) БОЕ/ мл. Данные пробы взяты 07.07.2016 с первичного отстойника. Относительно различных этапов очистки наблюдается уменьшение титра: $1,25 \cdot 10^3$ (не очищенные воды), $1,21 \cdot 10^3$ (первичный отстойник), $2 \cdot 10^2$ (аэротенк), 0 (вторичный отстойник) БОЕ/ мл. Пробы отобраны 07.07.2016 и высеяны на штамм BL21. Относительно проб, отобранных в различный временной промежуток и высеянных на штамм В, наблюдается определенная постоянность и составляет $(1,1 \pm 0,05) \cdot 10^3$ БОЕ/ мл. При изучении морфологии бляшек было отмечено огромное разнообразие. При высева на штамм *E.coli* В большинство бляшек были прозрачные или слегка мутные и имели не четко очерченные края, при этом варьировали в размере от 0,8 мм до 1,5 мм (Рис.1.). Также были обнаружены негативные колонии большего размера, например, размером до 2,8 мм диаметром, слабо мутные с расплывчатым ореолом. Была также обнаружена бляшка общим диаметром примерно 3,7 мм с прозрачным центром диаметром 0,6 – 0,7 мм и широким ореолом одинаковой мутности толщиной около 1,6 мм.

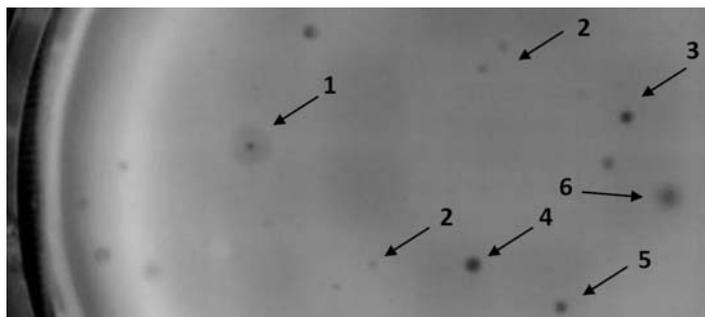


Рис.1. Пример разнообразия бляшек при высеве пробы из очистных сооружений на штамм *E.coli* В. 1 - Крупная бляшка с прозрачной серединой и широким мутным ореолом, 2 – мелкие мутные бляшки; 3 – 4 – средние по размеру прозрачные бляшки; 5 – мелкая прозрачная бляшка; 6 – крупная бляшка с мутными краями или узким

Обсуждение. Оценивая полученные данные, можно обратить внимание на слабо варьирующее изменение титра фагов на штамме В. Возможно использование этого штамма для мониторинга. Можно сделать вывод о том, что на этапе очистки во втором отстойнике, содержание живых колиформных бактерий близко к ничтожному. Наблюдая за морфологией негативных колоний, нами были обнаружены виды с изменяющейся плотностью бактерий, от полного отсутствия их, до небольшого количества, участок без лизированных микроорганизмов и опять мутного цвета, при визуальном обзоре образуется некий ореол, что говорит о вариации процессов жизнедеятельности фагов во время роста бляшки. В общем же рассмотрении, можно сделать вывод об огромном разнообразии присутствовавших бактериофагов.

Выводы. (1) Нами были получены титры бактериофагов и изучена морфология, образуемых ими бляшек на таких штаммах *E.coli* как С600, ДН1, В, ВL21, а также создана рабочая коллекция бактериофагов. (2) Были проведены исследования по подбору необходимых объемов проб, для удобной работы со сточными водами города Пушкино. (3)

Проведен подбор методик очистки, для выявления фаговых частиц, которые могли быть утеряны из-за условий того или иного эксперимента.

Заключение. В результате, наше исследование дает возможность говорить о перспективе такого объекта, как сточные воды, о необходимости их более детального изучения. Данные, которые можно получить из этих исследований, важны для экологии, микробиологии и бактериофагии.

Благодарности. Авторы благодарят лаборанта Дручкову Ю.Н. за техническую помощь.

Список литературы

7. Suzuki D. T. et al. An introduction to genetic analysis. – WH Freeman and Company, 1986. Ed. 3.
8. Крылов В. М. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий/Крылов В. М.//Генетика. -2003. -Т. 39, N5.595-620.
9. Hennes K. P., Simon M. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake //Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Т. 61. – №. 1. – С. 333-340.
10. Weigle P., Raleigh E. A. Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses //Chemical Reviews. – 2016.
11. Тимаков В. Д., Гольдфарб Д. М. Экспериментальное обоснование нового принципа обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий с помощью фага. – 1956.
12. Weber-Dąbrowska B. et al. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes //Frontiers in Microbiology. – 2016. – Т. 7.

Улучшение каталитических свойств ЭГ2 *P.verruculosum* с помощью сайт-направленного мутагенеза

Вахрушева А.В.¹, Матыс В.Ю.¹, Беккаревич А.О.¹, Бубнова Т.В.¹, Доценко А.С.², Рожкова А.М.², Сеницын А.П.², Немашкалов В.А.¹

¹ Лаборатория биосинтеза ферментов ИБФМ РАН

² ФИЦ Биотехнологии РАН

Основными компонентами растительного сырья являются целлюлоза и гемицеллюлоза. Для глубокого гидролиза растительного сырья в современной промышленности применяют целлюлазные ферментные препараты, одним из основных компонентов которых является эндоглюканаза, катализирующая преимущественно расщепление аморфных участков целлюлозы. Следовательно, увеличение каталитической активности эндоглюканазы может привести, в конечном счете, к увеличению эффективности переработки растительного сырья.

Таким образом, целью данной работы заключалась в улучшении биохимических и каталитических свойств эндоглюканазы 2 из промышленного грибного продуцента ферментов *P.verruculosum*.

Известно, что изменение степени N-гликозилирования приводит к значительному изменению активности фермента. Поэтому в структуре данного фермента были найдены сайты гликозилирования и осуществлены точечные а/к замены, которые привели к мутации сайтов N-гликозилирования (Рис.1).



Рис. 1. Гликозилирование ЭГII из *P.verruculosum*

Далее методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P.verruculosum* в качестве матрицы был амплифицирован ген целевого фермента ЭГ2, содержащий необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторной области гена ксиланазы А *P.canescens* и терминаторной области ЭГ3 *P.canescens*, а также необходимые генетические элементы для репликации в клетках *E.coli*. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки *E.coli* для наработки ДНК.

На следующем этапе трансформация лабораторного штамма-реципиента *P.canescens* позволила получить рекомбинантные штаммы, продуценты мутантных форм ЭГ2. В результате масс-спектрометрического анализа мутантных форм белков N-гликозилирование было детектировано для сайтов N42 и N194, N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды (Табл.1), в случае сайта N19 гликозилирование обнаружено не было.

Таблица 1

Сайты N-гликозилирования и структура N-связанных гликанов, установленные с использованием сервиса GlycoMod, для рекомбинантных и нативной форм ЭГ2 *P.verruculosum*

Сайт N-гликозилирования	Структура N-связанных гликанов					
	рекомб. б. ЭГП	рекомб. ЭГП N19A	рекомб. ЭГП N42A	рекомб. ЭГП N194A	нативн. ЭГП	
N19		н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
N42		(Man) ₄ - ₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₂ - ₉ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₂ - ₉ (GlcNAc) ₂	(Man) ₄ - ₈ (GlcNAc) ₂
N194		(Man) ₁ - ₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁ - ₈ (GlcNAc) ₂	(Man) ₁ - ₈ (GlcNAc) ₂	-----	(Man) ₁ - ₈ (GlcNAc) ₂

н.д. – не детектировано

Далее были исследованы биохимические свойства гомогенных белков (Рис.2).

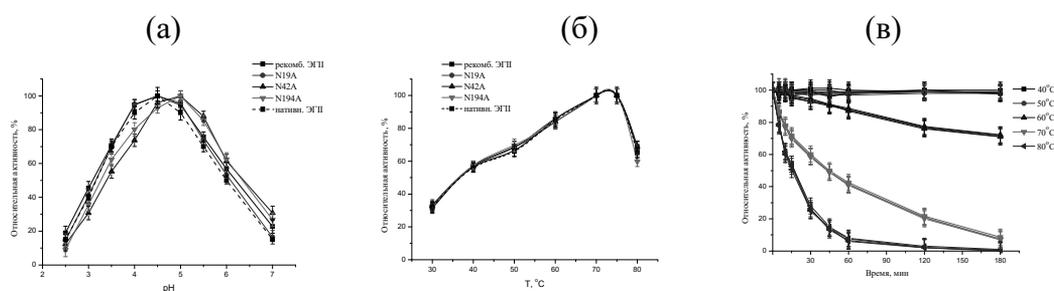


Рис. 2. Биохимические свойства мутантных форм ЭГ2: (а) рН-профили относительной активности по отношению к β-глюкану, (б) температурные профили относительной активности по отношению к β-глюкану, (в) термостабильность при 40-80°C

Установлено, что рН- и Т-оптимумы активности по β-глюкану не меняются или меняются незначительно. Однако две из трех осуществленных мутаций привели к увеличению каталитической активности ЭГП по специфическим субстратам β-глюкану и карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ).

Для исследования осаживающей способности мутантных и немутантных форм ЭГ2 был проведен гидролиз β-глюкана и измельченной осиновой древесины (Рис.3).

Из полученных данных видно, что мутантные и немутантные формы ЭГ2 полностью гидролизуют β-глюкан за 3 часа. При этом гидролитическая способность мутантных форм N42A и N194A оказалась выше, а формы N19A – ниже способности немутантных форм. При гидролизе измельченной осиновой древесины различие в концентрации глюкозы наблюдалось через 24 часа гидролиза. Выход глюкозы в случае форм N42A и N194A был выше соответственно на 10,5 и 26,9%, в случае формы N19A – на 10,2% ниже по сравнению с немутантными формами.

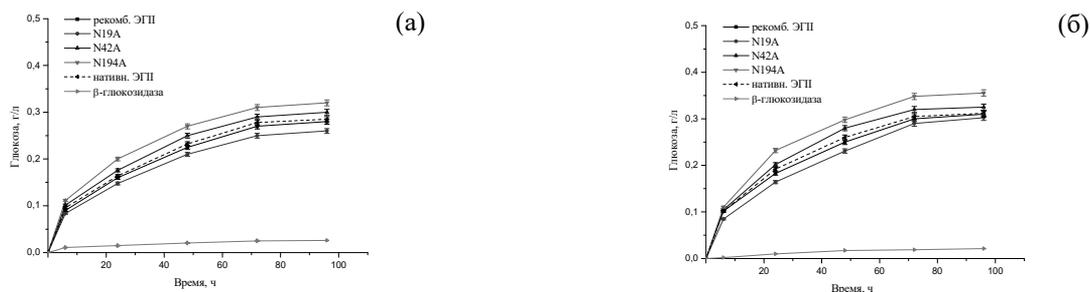


Рис. 3. Кинетические кривые накопления глюкозы при гидролизе (а) β -глюкана и (б) измельченной осиновой древесины под действием мутантных и немутантных форм ЭГ2

Выводы:

1. Определены тип и структура N-связанных гликанов ЭГ2 из *P.verruculosum*, представляющих собой высокоманнозные олигосахариды.
2. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы ЭГ2 с измененными сайтами N-гликозилирования.
3. Удаление N-связанных гликанов, расположенных на входе и выходе из активного центра, приводит к увеличению активности фермента.
4. Использование мутантных форм ЭГ2 *P.verruculosum* позволяет до 27% увеличить выход глюкозы при гидролизе целлюлозосодержащих материалов.

**Структура эндоглюканазы 2 мицелиального гриба
*Penicillium verruculosum***

**Вахрушева А. В.¹, Матыс В.Ю.¹, Беккаревич А.О.¹, Бубнова Т.В.¹,
Тищенко С.В.², Габдулхаков А.Г.², Доценко А.С.³, Рожкова А.М.³,
Синицын А.П.³, Немашкалов В. А.¹**

¹ Лаборатория биосинтеза ферментов ИБФМ РАН

² ФГБУ Институт белка

³ ФИЦ Биотехнологии РАН

В настоящее время использование ферментных препаратов в качестве кормовой добавки является ключевым условием для эффективного животноводства [1], главным образом, свиней и птицы. Основой комбикормов для сельскохозяйственных животных являются злаковые культуры, такие как овёс, рожь, пшеница, ячмень и другие, клеточная стенка которых содержит в своём составе труднорасщепляемые некрахмальные полисахариды (НПС) [2]. НПС обладают, так называемыми, антипитательными свойствами, что приводит к уменьшению скорости прохождения корма по пищеварительному тракту, снижению его переваримости и эффективности всасывания питательных веществ.

Ключевыми ферментами, используемыми в качестве кормовой добавки для расщепления растворимых НПС, являются β -глюканазы, в число которых входят эндо-1,4- β -глюканазы (ЭГ2). В качестве промышленно важных продуцентов данных ферментов используются грибы из родов *Trichoderma* и *Penicillium*. На сегодняшний день последние особенно перспективны благодаря своей продуктивности и способности синтезировать активный и сбалансированный по своему составу ферментный комплекс, а также высокой операционной стабильности индивидуальных компонентов этого комплекса [3].

Эндо-1,3(4)- β -глюканаза была выделена из *Penicillium verruculosum* и закристаллизована методом диффузии паров в висячей капле. Структура была определена методом молекулярного замещения и уточнена до $R_{\text{cryst}}=21.8\%$ и $R_{\text{free}}=25.9\%$ при разрешении 2.1 Å. Полученная модель удовлетворяет всем стереохимическим и рентгеноструктурным критериям. Координаты модели депонированы в банк белковых структур (PDB код 5I6S).

ЭГ2 – однодоменный белок, состоящий из 314 аминокислотных остатков. Данный фермент относится к классу α/β -белков, подклассу так называемых TIM (β/α)₈-бочонков (Рис. 1). В полученной структуре ЭГ2 к одному из потенциальных сайтов гликозилирования (N42) ковалентно присоединены последовательно две молекулы N-ацетилглюкозамина и одна молекула маннозы.

Кроме того, был проанализирован каталитический центр данного фермента и выявлены аминокислотные остатки, отвечающие за расщепление гликозидной связи в полисахаридах.

Таким образом, в данной работе была определена пространственная структура изолированной ЭГ2 из *P. Verruculosum* (PDB код 5I6S). Информация о структурных особенностях ЭГ2 должна стать основой для работ по сайт-направленному мутагенезу фермента с целью придания ему нужных свойств (сдвиг температурного и pH-оптимумов активности фермента, модификация субстратной специфичности, степени гликозилирования и т.д.), а также увеличения его активности.

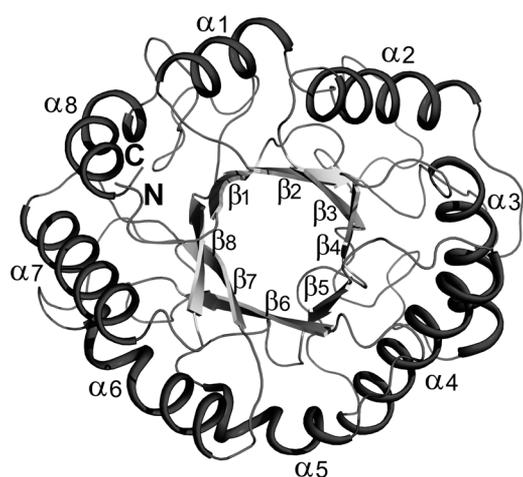


Рис. 1. Пространственная структура ЭГ2 (вид сверху)

Список литературы

1. Ravindran V. // J. Appl. Poult. Res. 2013. V. 22. № 3. P. 628.
2. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. // Катализ в промышленности. 2010. № 5. С. 64.
3. Соловьёва И.В., Окунев О. Н., Вельков В.В. и др. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 172.

Влияние консервантов на рост и продукцию микотоксинов грибами контаминантами сыров и колбас

Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.

Лаборатория вторичных метаболитов ИБФМ РАН

В настоящее время на сыродельных и мясоперерабатывающих производствах особое внимание уделяется профилактике поражения пищевых продуктов мицелиальными грибами. Основными контаминантами этих производств являются грибы аскомицетного аффинитета, среди которых доминируют пенициллы. Для большинства из них известна продукция разнообразных микотоксинов. В сырах часто обнаруживают цитринин, циклопиазоновую кислоту, микофеноловую кислоту и рокефортин. Количественное содержание этих микотоксинов в сырах не регламентируется, в отличие от афлатоксинов, из-за их меньшей токсичности. Однако микотоксины пенициллов обладают мутагенными, нейротоксичными, нефротоксичными и иммуносупрессорными свойствами и могут представлять опасность для здоровья в результате синергического эффекта.

Для предотвращения контаминации производств и продуктов повсеместно используют консерванты, например, сорбиновую и бензойную кислоты и их соли, нитриты натрия или калия и другие соединения. Их применяют в пищевой промышленности уже длительное время, используя такие свойства, как подавление роста грибов, дрожжей, некоторых бактерий и относительную безопасность для здоровья потребителя. При утверждении консервантов в качестве составной части продукта были произведены многочисленные исследования, показавшие, что добавку можно считать безвредной в концентрациях не превышающих предельно-допустимую норму (ПДН). ПДН консервантов в готовом изделии установлена отдельно для каждого вида продуктов и находится в пределах 0.02-0.2% для сорбата калия, 0.015-0.4% для бензоата натрия, содержание нитрита натрия в готовом продукте не должно превышать в России – 0.005%, а в странах ЕС – 0.015%.

Ранее было исследовано влияние сорбата калия (СК) на продукцию микотоксинов мицелиальными грибами. Сорбат в концентрациях 0.05-0.3% ингибировал продукцию микотоксинов, включая афлатоксины, патулин, цитринин, стеригмацистин и охратоксин. Степень ингибирования микотоксинов сорбатом иногда зависела от типа микотоксинов, например, ингибирование афлатоксина В₁ было больше, чем афлатоксина G₁. Было отмечено, стимулирующее влияние сорбата при концентрации менее 0.05% на образование афлатоксина В₁ и Т-2 токсина *Aspergillus flavus* и *Fusarium acuminatum* соответственно. Влияние других консервантов, например, бензоата натрия (БН) и нитрита натрия (НН) на продукцию микотоксинов грибами исследовано не было.

Целью работы было изучение влияния консервантов на рост и продукцию α-циклопиазоновой кислоты (ЦПК), цитринина, микофеноловой кислоты (МФК) пенициллами, которые наиболее часто контаминируют сыры и колбасные изделия, – *P. commune*, *P. citrinum* и *P. brevicompactum*.

Объектами исследования служили грибы *P. brevicompactum* ВКМ F-4480, *P. citrinum* ВКМ F-3942, *P. commune* ВКМ F-4500, полученные из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН и выделенные ранее с поверхности сыров, колбас и воздуха предприятий. Грибы выращивали при поверхностном и глубинном культивировании на минеральной среде, благоприятной для биосинтеза микотоксинов. 10%-растворы консервантов стерилизовали фильтрованием через мембранные фильтры и вносили в стерилизованные среды перед засевом. Отбор проб проводили ежедневно. Микотоксины извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией

хлороформом при кислых значениях рН. Количественное содержание микотоксинов в экстрактах определяли спектрофотометрически.

При изучении влияния НН была взята максимально-допустимая концентрация (0.015%) в продуктах питания. Выявлено, что НН оказал влияние только на рост гриба *P. brevicompactum*: лаг фаза удлинилась до 120 часов, максимальная удельная скорость (μ_{\max}) снизилась на 35%, а урожай биомассы на 30% по сравнению с контролем. Этот консервант не повлиял на показатели роста грибов *P. commune* и *P. citrinum*.

У изученных грибов внесение БН в минимально допустимой концентрации (0.02%) привело к снижению максимальных удельных скоростей роста. Следует отметить, что наибольшее снижение μ_{\max} наблюдалось у *P. commune* – на 18% , а у *P. brevicompactum* и *P. citrinum* только на 8 и 3% по сравнению с контролем соответственно.

Предварительно было проведено изучение различных концентраций СК (0.01, 0.05, 0.1 и 0.2%) на рост грибов при поверхностном культивировании на агаризованной среде. Обнаружено, что рост грибов наблюдался только при концентрации 0.01%. При изучении влияния СК на продукцию микотоксинов была взята эта концентрация. В присутствии СК наибольшее снижение μ_{\max} отмечено у *P. brevicompactum* – на 39% , а у *P. commune* и *P. citrinum* снижение μ_{\max} было значительно ниже – на 7 и 3% по сравнению с контролем соответственно.

По изучению влияния консервантов на максимальные показатели биосинтеза микотоксинов грибами, выявлено, что НН повлиял негативно только на биосинтез цитринина грибом *P. citrinum*. На это указывает снижение на 20% по сравнению с контролем максимальной концентрации цитринина в среде и выход продукта от биомассы ($Y_{p/x}$). НН не повлиял на биосинтез МФК грибом *P. brevicompactum*, хотя при внесении к культуре этого консерванта наблюдалось снижение максимальной концентрации МФК на 30% по сравнению с контролем. Однако это связано со снижением показателей роста гриба в присутствии НН, что подтверждают одинаковые значения $Y_{p/x}$. Показатели биосинтеза ЦПК грибом *P. commune* были аналогичны контролю.

БН стимулировал биосинтез всех микотоксинов продуцентами. При его внесении как максимальное накопление ЦПК, цитринина и МФК в среде, так и $Y_{p/x}$ выросли в 1.7, 1.5 и 1.7 раза по сравнению с контролем соответственно.

СК оказал различное влияние на биосинтез ЦПК, цитринина и МФК продуцентами. Этот консервант повлиял негативно только на биосинтез цитринина грибом *P. citrinum* – показатели его биосинтеза были на 13% ниже контроля. Биосинтез ЦПК и МФК продуцентами усилился, так как показатели биосинтеза ЦПК и МФК выросли в 1.7 и 2.6 раза соответственно. Ранее было отмечено, что стимуляция продукции микотоксинов минимальной ингибирующей концентрацией сорбата возможна благодаря снижению активности ЦТК, в результате также происходит накопление внутриклеточной концентрации ацетил-КоА. ЦПК относится к эргоалкалоидам, для биосинтеза которых требуется низкая активность ЦТК и активное функционирование пентозофосфатного пути, ведущего к образованию триптофана, основного предшественника ЦТК. Вероятно, этим объясняется стимулирующее влияние сорбата на биосинтез ЦПК и МФК.

Таким образом, показано, что влияние консервантов в используемых концентрациях на рост грибов видоспецифично. Наибольшее негативное действие на рост *P. brevicompactum* оказали нитрит натрия и сорбат калия, на *P. commune* – бензоат натрия.

Слабое влияние всех консервантов отмечено на рост *P. citrinum*. Установлено, что нитрит натрия снижает продукцию цитринина и МФК и не влияет на образование ЦПК продуцентами. В субингибирующих концентрациях бензоат натрия стимулировали биосинтез всех микотоксинов, а сорбат калия ЦПК и МФК.

Сравнительная оценка окисления интактными клетками, бесклеточным экстрактом и мембранными фракциями штаммов *Glucanobacter oxydans* 9.7 и *Glucanobacter oxydans* 9.4 глюкозы, этанола, ксилозы, арабинозы

Быков А.Г., Решетилов А.Н.

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Перспективным направлением биотехнологии является разработка электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов, получающих энергию при окислении органических соединений. Поскольку получение чистых ферментов в значимых количествах для использования в биосенсорах и биотопливных элементах является дорогостоящей процедурой, была рассмотрена возможность использования целых клеток, фрагментов клеточных мембран бактерий и бесклеточных экстрактов как альтернатива использованию чистых ферментов.

Целью работы было сравнение интенсивности окисления субстрата интактными клетками, бесклеточным экстрактом и мембранными фракция для одного штамма, а так же сравнение этих же параметров у двух штаммов рода *Glucanobacter*.

Представители данного рода способны окислять ряд сахаров, спиртов и родственных соединений и активно применяются в биотехнологической промышленности.

Усвоение субстратов оценивалось по дыхательной активности микроорганизмов с помощью электрода Кларка, регистрирующего изменение концентрации кислорода в омывающем биосенсор буферном растворе, в ответ на добавление субстрата в известной концентрации. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода.

В работе показаны результаты исследования чувствительности к сахарам (глюкозе, ксилозе, арабинозе) и этанолу микробных биосенсоров на основе интактных клеток, бесклеточного экстракта, суммарных мембранных фракций бактерий штамма *G. oxydans* 9.4 и *G. oxydans* 9.7 лабораторной коллекции микроорганизмов. Биоматериал был иммобилизован методом физической адсорбции на хроматографической бумаге. Количество биомассы оценивалось по содержанию белка (методика Бредфорд) и по сырой массе бактерий. Результаты приведены на рис. 1 и в таблице 1.

Таблица 1

Ответы биосенсора на субстраты одинаковой концентрации (нА/с)

субстраты	<i>G. oxydans</i> 9.4			<i>G. oxydans</i> 9.7		
	интактные клетки	бесклет-й экстракт	мембр-е фракции	интактные клетки	бесклет-й экстракт	мембр-е фракции
глюкоза	0,10	0,10	0,12	0,27	0,18	0,09
ксилоза	0,02	0,01	0,02	0,04	0,03	0,02
арабиноза	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
этанол	0,23	0,10	0,13	1,19	0,88	0,20

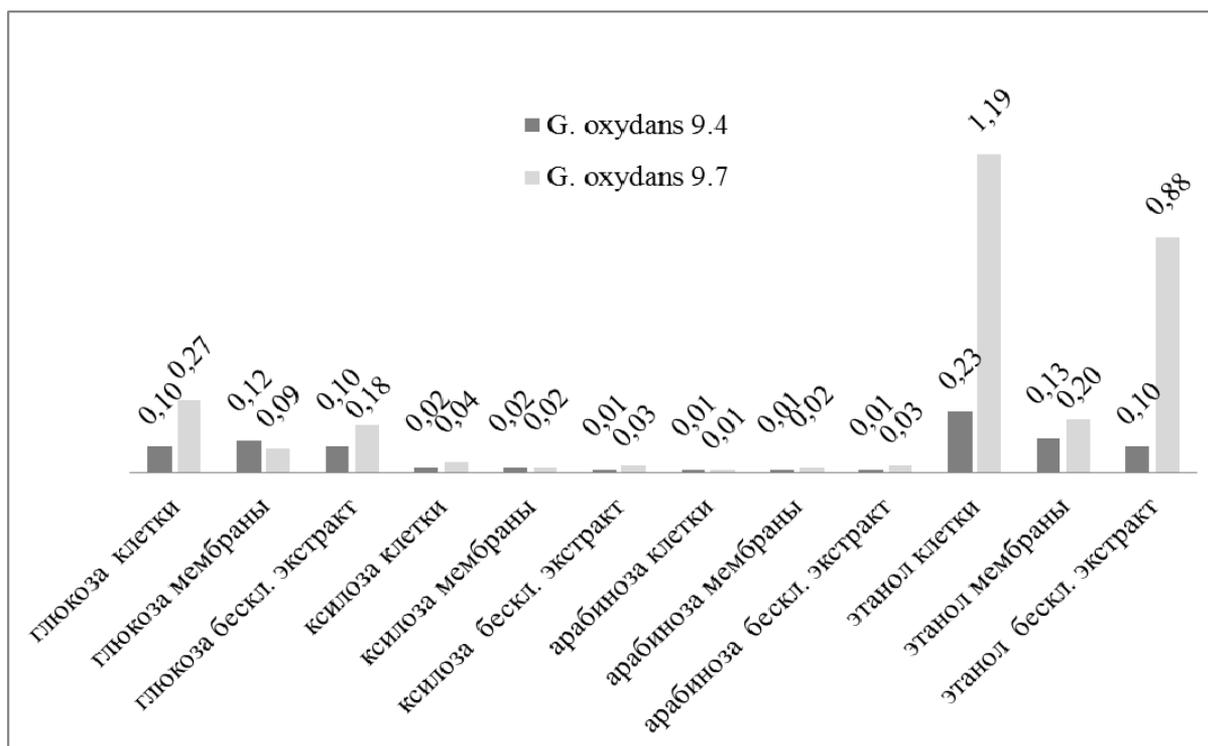


Рис. 1. Сравнительная характеристика ответа различных фракций двух штаммов на субстрат

При сравнении двух штаммов более высокие значения сигналов наблюдались у фракций штамма *G. oxydans* 9.7. Однако эксперимент показал, что при сравнении сигналов для одного штамма наибольшая дыхательная активность проявлялась у интактных клеток.

Добавление в измерительную ячейку глюкозы в качестве субстрата вызвало у интактных клеток штамма *G. oxydans* 9.7 ответ почти на 170 % более высокий, а для бесклеточного экстракта на 80 %, чем ответ соответствующих фракций штамма *G. oxydans* 9.4. Мембранные фракции в целом показали снижение дыхательной активности по сравнению с интактными клетками и бесклеточным экстрактом.

При введении ксилозы, максимальный ответ сенсора был зарегистрирован для интактных клеток штамма *G. oxydans* 9.7 в 2 раза более высокий в сравнении со штаммом *G. oxydans* 9.4. При разрушении клеток дыхательная активность ферментов снижалась.

При сравнении сигналов фракций двух штаммов на арабинозу нашли, что наибольший ответ демонстрировали мембранные фракции и бесклеточный экстракт (в 2 и в 3 раза соответственно) штамма *G. oxydans* 9.7.

Введение этанола в измерительную ячейку приводило к наибольшему ответу по сравнению с остальными субстратами, причем наибольшую дыхательную активность проявили интактные клетки. Сравнивая реакцию штаммов можно заключить, что большей чувствительностью к этанолу обладает *G. oxydans* 9.7.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у биосенсоров и биотопливных элементов на основе разрушенных клеток данных штаммов значительно снижается чувствительность к ряду субстратов.

Потребление кислорода иммобилизованными аэробными метилотрофными бактериями как подход для определения алифатических метилированных аминов

**Кувичкина Т.Н., Гридина В.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.,
Троценко Ю.А., Решетилов А.Н.**

Лаборатория биосенсоров, лаборатория радиоактивных изотопов ИБФМ РАН

Алифатические метилированные амины как общие предшественники в органическом синтезе применяются в производстве инсектицидов, ускорителей вулканизации резиновых изделий, лекарственных средств, растворителей. Метиламин используется в производстве фунгицидов, дубильных веществ, красителей, ракетных топлив. Промышленное производство метиламина составляет 1.0×10^6 т/год. Диметиламин используется в производстве гербицидов и моющих средств. Триметиламин необходим при производстве бактерицидов, кормовых добавок, реагентов для флотационных процессов. Известно, что накопление метилированных аминов в грунтовых водах приводит к ухудшению качества питьевой воды. Предельно допустимая концентрация метиламина в воде составляет 1 мг/л (33 мкМ). Поскольку метиламин обладает токсическим действием, необходимо контролировать его концентрацию в процессе производства. Известен хроматографический метод определения алифатических аминов, в том числе метиламина, в газовой фазе [1]. Взаимодействие алифатических метилированных аминов с аэробными метилотрофными бактериями приводит к изменению их дыхательной активности, обусловленной, в том числе, окислением метилированных аминов оксидоредуктазами метиловых бактерий с потреблением молекулярного кислорода.

Целью работы являлось исследование использования иммобилизованных метилотрофных бактерий *Methylobacterium extorquens* ВКМ В-2067, *Paracoccus kondratievae* ВКМ В-2222 и *Methylopila musalis* ВКМ В-2646 в качестве биорецептора микробного биосенсора амперометрического типа для определения метилированных аминов.

Штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Штамм *Methylopila musalis* выделен из банана и назван *Methylopila musalis* sp. nov. (типовой штамм ВКМ В-2646Т=DSM 24966Т=CCUG 61696Т) [2]. Бактерии выращивали в жидкой среде в колбах на качалке. Биомассу (конец экспоненциальной фазы роста) отделяли центрифугированием, дважды промывали буфером. Суспензию клеток использовали для иммобилизации. Иммобилизованные клетки получали методом физической адсорбции на носителе (хроматографическая стеклотапа GF/A). В качестве преобразователя использовали кислородный электрод Кларка. Электрохимические измерения проводили в 50мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.5), насыщенном кислородом, при комнатной температуре в открытой кювете объёмом 2 мл при помощи гальванопотенциостата «IPC2000» («Kronas», Москва). Регистрируемым параметром при фиксированном потенциале (-700мВ) являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/мин), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потреблённого кислорода (ответ биосенсора). Выявлено, что все три исследуемые штаммы способны использовать метиламин в качестве источника углерода, азота.

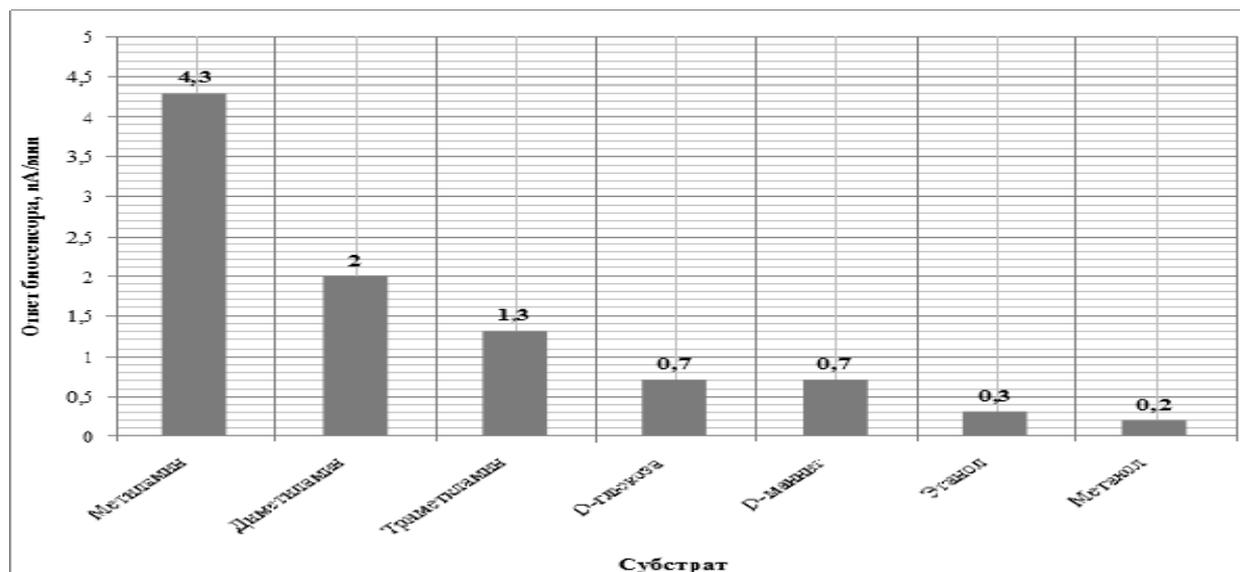


Рис.1. Субстратная специфичность *Paracoccus kondratievae* VKM B-2222

Из рис.1 видно, что иммобилизованные клетки *Paracoccus kondratievae* VKM B-2222 наибольшие ответы лают на метилированные амины по сравнению с другими субстратами. Однако по отношению к метиламину ферментные системы штамма *Methylopila musalis* VKM B-2646, которые служат основой биокаталической активности, оказалась на порядок активней, чем у двух других метиловобактерий. При использовании штамма *Methylopila musalis* VKM B-2646 в качестве биорецептора диапазон определения метиламина составлял 4 – 250 мкМ. Операционная стабильность составляла 5 суток [3].

Список литературы

1. Anthoni U., Christophersen C., Gramm L., Nielsen N., Nielsen P. Poisonings from flesh of the Greenland shark *Somniosus microcephalus* may be due to trimethylamine // *Toxicon*. 1991. V. 29. P. 1205-1212.
2. Doronina N.V, Kaparulina E.N., Bykova T.V., Trotsenko Yu.A. *Methylopila musalis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013. V.63. P.1847-1852. 4. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М. Л. Аэробные метиловобактерии // Пуцдино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2010. 325 с.
3. Кувичкина Т. Н., Капаруллина Е.Н., Решетиллов А. Н. Окисление метиламина иммобилизованными метиловобактериями *Methylopila musalis* VK2646 // Евразийский союз учёных (ЕСУ) г. Москва. 2015. Ч. 7. №5 (14). С.21-23.

Выбор проводящего биополимера для микробного биотопливного элемента на основе клеток *Glucanobacter oxydans*

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

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Биотопливные элементы (БТЭ) относятся к устройствам, осуществляющим прямое превращение химической энергии различных соединений в электрическую в процессе биологической трансформации. БТЭ относятся к альтернативным источникам энергии, и интерес к их разработке обусловлен во многом возможностью использования в них в качестве топлива отходы производств. У микробных биотопливных элементов (мБТЭ) есть 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. Способ иммобилизации биоматериала на поверхности электродов является одним из факторов, влияющих на мощность БТЭ. При создании микробных датчиков для иммобилизации клеток *G. oxydans* на поверхности преобразователей применяют различные полимеры, как био-, так и синтетические. Каждый из них обладает своими особенностями и может успешно применяться при создании микробных БТЭ, однако для получения наиболее мощной системы необходимо полноценное изучение электрохимических характеристик БТЭ на основе каждого из этих полимерных материалов.

Целью работы было исследовать и сравнить электрохимические параметры БТЭ при использовании для иммобилизации клеток бактерии *G. oxydans* на поверхности анода БТЭ следующих полимеров: хитозан, поливиниловый спирт (ПВС) и ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном (ПВС_м).

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанные кюветы, объем анодного отделения был равен объему катодного и составлял 5 мл. В качестве анода и катода БТЭ использовались спектральные графитовые электроды. Для оценки электрохимических свойств БТЭ, модифицированных различными проводящими полимерами, использовались методы амперометрии, циклической вольтамперометрии и импедансной спектроскопии.

Были получены сигналы электродов на введение одинакового количества субстрата (10 мМ этанола) при разных способах иммобилизации биоматериала. На рис. 1 представлены зависимости тока от времени для трех различных систем. Наибольшая амплитуда генерируемого тока соответствует биоэлектроду, содержащему хитозан в качестве полимерной матрицы (160 мкА). Электродам, модифицированным ПВС и ПВС_м, соответствуют амплитуды сигнала, равные 110 и 130 мкА, соответственно.

Для проверки работы данных полимерных матриц в реальных условиях работы БТЭ с помощью метода циклической вольтамперометрии были получены циклические вольтамперные характеристики трех различных вариантов БТЭ. Каждая циклическая вольтамперная характеристика была преобразована в мощностную зависимость (рис. 2), где максимальная точка по оси Y соответствует максимальной удельной мощности соответствующего биотопливного элемента. При разработке БТЭ необходимо добиваться максимальной мощности, поэтому чем выше это значение, тем эффективнее следует признать используемый биополимер. Вновь наибольшее значение удельной мощности (7.8 мкВт/см²) продемонстрировал БТЭ, содержащий хитозан в качестве биополимера. Остальные БТЭ показали значения удельной мощности в районе 6 мкВт/см².

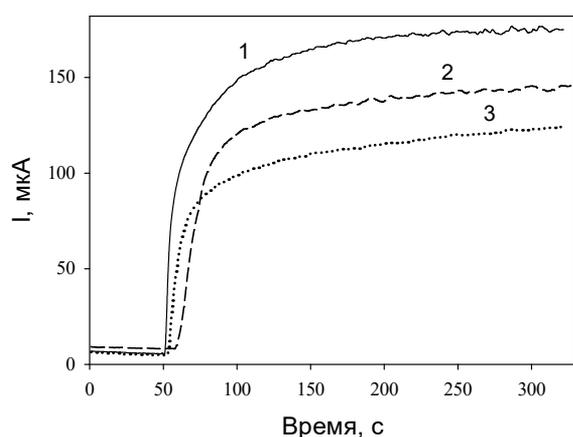


Рис. 1. Виды сигналов электродов на основе клеток *G. oxydans*, модифицированных различными полимерами: 1 – хитозаном; 2 – ПВХ; 3 – ПВХ_М.

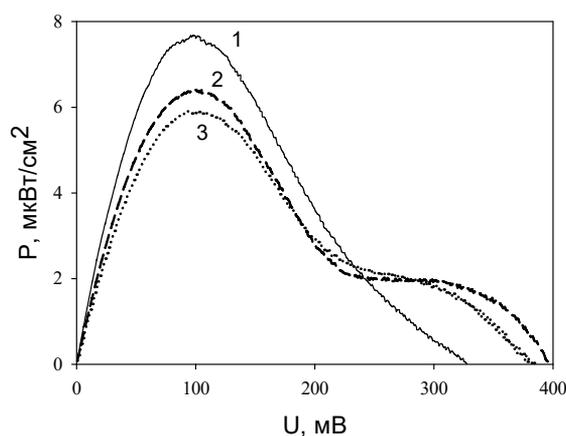


Рис. 2. Виды мощностных характеристик электродов на основе клеток *G. oxydans*, модифицированных различными полимерами: 1 – хитозаном; 2 – ПВХ; 3 – ПВХ_М.

Для модификации электродов биосенсоров и БТЭ наноматериалами чаще всего используются углеродные нанотрубки. Влияние биополимера на характеристики БТЭ при модификации биоанода углеродными нанотрубками представлено в таблице. Для этого измеряли сопротивление биоанода, общее внутреннее сопротивление БТЭ, его внутреннюю мощность и амплитуду генерируемого им тока.

Как видно из таблицы, модификация биоанодов углеродными нанотрубками приводит к максимальному увеличению мощности БТЭ до 9.93 мкВт/см², при этом сопротивление биоанода снижается до 722 Ом см², что на 30% ниже сопротивления биоанода, модифицированного поливиниловым спиртом. Данные, полученные тремя разными электрохимическими методами, коррелируют друг с другом, поэтому можно сделать однозначный вывод, что модификация анода БТЭ углеродными нанотрубками в сочетании с полимером хитозаном в соотношении 2:1 вызывает максимальный эффект увеличения мощности и снижения внутреннего сопротивления БТЭ, что позволит в дальнейшем использовать иммобилизацию бактерий в гель хитозана для создания более эффективных и производительных микробных БТЭ.

Таблица

Значения электрохимических параметров для биоанодов на основе СГЭ, модифицированных ФМНТ и в геле хитозана, соотношение клеток и полимера на поверхности электрода равно 2:1

	R_A при $U=-150$ мВ, Ом см ²	$R_{ВНУТР}$, Ом см ²	$P_{уд}$, мкВт/см ²	ΔI , мкА
ПВС	908.00±52.02; 5.73 %	1218.98±43.46; 3.57 %	7.92±0.51; 6.44 %	139.64±4.79; 3.43 %
ПВС _М	1088,0± 70,4; 6,47 %	1277.11±53.84; 4.22 %	7.23±0.80; 10.99 %	147.16±10.01; 6.80 %
Хитозан	722,0± 30,4; 4,21 %	1077.66±135.00; 12.53 %	9.93±0.78; 7.83 %	193.98±14.36; 7.40 %

Работа поддержана грантом «Биосенсоры и биотопливные элементы на основе электродов, модифицированных нано-материалами» Государственное Задание Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К.

Амперометрическое определение мальтозы

Емельянова Е.В., Решетиллов А.Н.

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Мальтоза (солодовый сахар) – это дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы. В пищевой промышленности её используют в виде мальтозной патоки, которую получают при ферментативном расщеплении крахмала. Мальтозу применяют в пищевой промышленности при производстве продуктов детского питания, хлебобулочных изделий, в пивоварении и виноделии (для смягчения водки), а также при изготовлении питательных сред в микробиологии.

Кроме классических методов (газовая и жидкостная хроматография) для определения мальтозы используют различные методы биосенсорного анализа. Биосенсорный метод анализа позволяет относительно просто варьировать селективность определения. Для определения около 80 различных веществ, в том числе моносахаридов, дисахаридов, применяют амперометрические биосенсоры. Амперометрический микробный сенсор состоит из иммобилизованного микроорганизма и электрохимического датчика.

Целью настоящей работы было создание лабораторной модели биосенсора для определения мальтозы. В разработанной модели под действием мальтозы изменялся метаболизм и скорость потребления кислорода биорецептором. Кислородный электрод Кларка, сопряжённый с биорецептором, преобразовывал химический сигнал (концентрация кислорода) в электрический. Концентрацию мальтозы оценивали по скорости изменения силы тока (пропорциональна скорости потребления кислорода биорецептором) в ответ на внесение мальтозы.

Биорецептором служили иммобилизованные клетки микроорганизмов. Поскольку мальтозу получают при ферментативном расщеплении крахмала, среди исследованных культур были отобраны две (бактериальная В-4с/3 и грибная F-6/2), выделенные из сточных вод производства картона. Комбинация рецепторов на основе этих культур позволила бы определять мальтозу в присутствии крахмала (рис. 1).

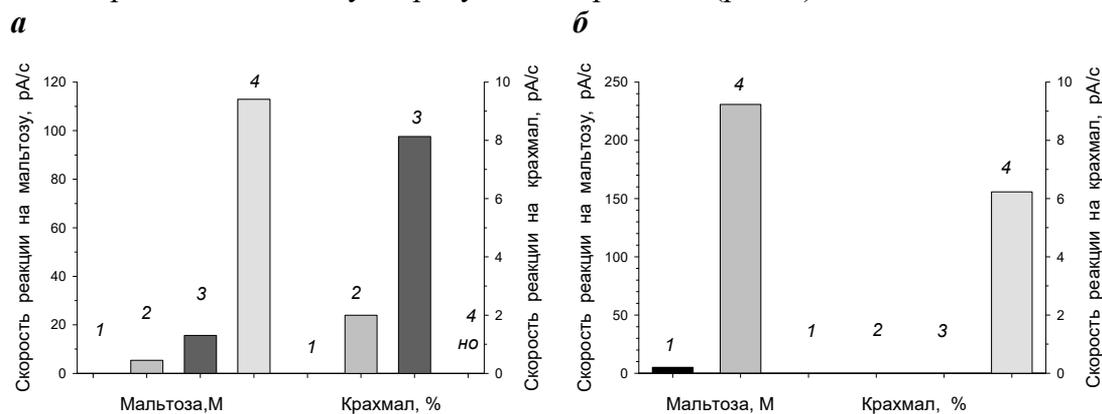


Рис. 1. Субстратная специфичность культур В-4с/3 (а) и F-6/2 (б), где концентрация мальтозы (М): 1 - 1×10^{-5} , 2 - 1×10^{-4} , 3 - 1×10^{-3} , 4 - 1×10^{-2} ; крахмала (%): 1 - 0.001, 2 - 0.005, 3 - 0.01, 4 - 0.05. (но – не определяли)

Для иммобилизации бактериальных клеток В-4с/3 (формирование биорецептора) были использованы фильтры фирмы Millipore, стекловолокнистая бумага Whatman и российские бумажные фильтры "цветная лента", для которых характерны различная плотность и диаметр пор. Бактериальные клетки иммобилизовали на мембране методом физической сорбции. При использовании фильтровальной бумаги фирмы Millipore лучшие результаты были получены для фильтров РН, стекловолокнистой бумаги фирмы Whatman – для GF/C и российских бумажных фильтров – для "белой ленты". На рисунке 2 приведены графики зависимости скорости реакции на мальтозу (реакция биорецептора) от концентрации мальтозы при использовании разных мембран. Для кривых, приведённых на рисунке 2, были получены следующие константы скорости реакции между мальтозой и иммобилизованными клетками: при использовании в качестве мембраны фильтров РН - $V_{max} = 478.8$ рА/с и K_m (каж) = 4.9×10^{-3} моль/л; для GF/C - $V_{max} = 134.7$ рА/с и K_m (каж) = 1.5×10^{-3} моль/л; для "белой ленты" - $V_{max} = 33.0$ рА/с и K_m (каж) = 2.7×10^{-3} моль/л.

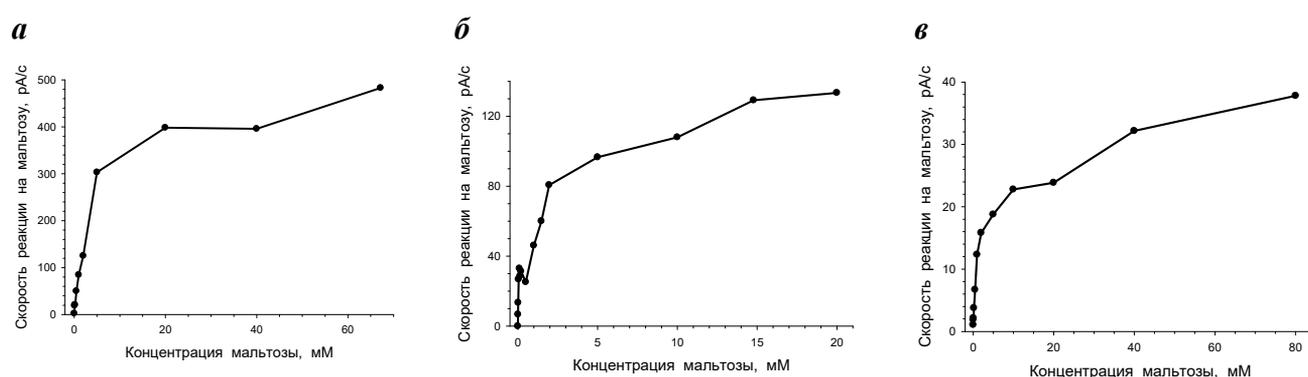


Рис. 2. Зависимость скорости реакции (ответ биосенсора) от концентрации мальтозы для клеток В-4с/3, иммобилизованных на различных мембранах:
а – РН; **б** - GF/C; **в** - "белая лента"

Ответ биосенсора существенно зависел также и от индукции ферментного пула в клетках культуры-рецептора, на что оказывал влияние состав среды, используемой для выращивания клеток (рис. 3).

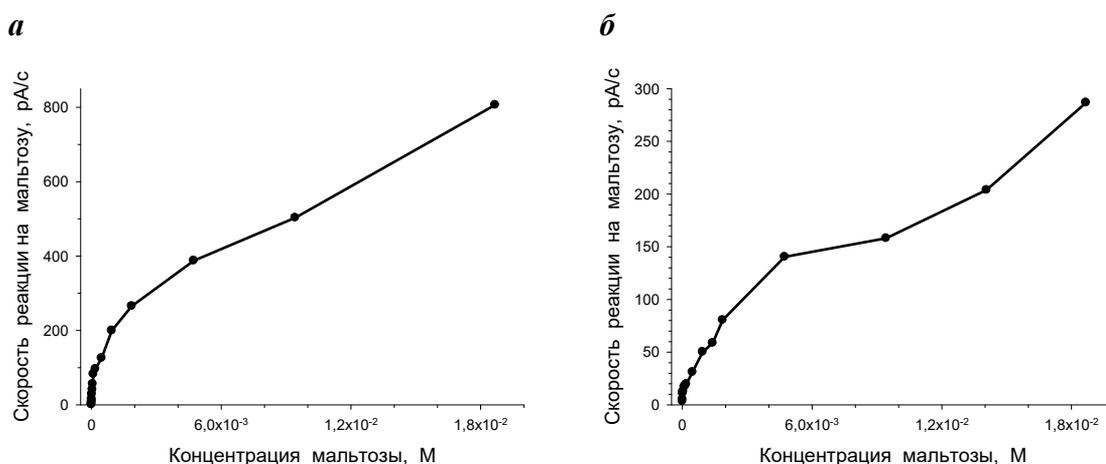


Рис. 3. Зависимость скорости реакции (ответ биосенсора) от концентрации мальтозы для клеток В-4с/3, выращенных на различных средах:
а – на СА; **б** – на пептон-триптонной среде

Все измерения проводили при комнатной температуре в измерительной кювете, оснащённой мешалкой, в 50 мМ калий-натрий фосфатном буфере при pH 7.4 -7.8. Регистрируемым параметром биосенсора была максимальная скорость изменения силы тока (dI/dt , ответ биосенсора - pA/c) в ответ на внесение мальтозы. Чувствительность биосенсора составляла 36.02 нА/(М·с). Нижний предел обнаружения мальтозы - не выше 1 мкМ, линейный диапазон градуировочного графика - 1.9 мМ – 14 мкМ. Разброс чувствительности сенсора не превышал 7%. Регистрация ответа сенсора начиналась через 60 - 100 сек после внесения пробы и заканчивалась через 10 – 60 сек. После промывания кюветы система была готова к следующему измерению через 6.5 – 11 мин. Биосенсор демонстрировал стабильный отклик при нахождении биорецептора в буферном растворе при комнатной температуре в течение 3-х суток и сохранял чувствительность при хранении биорецептора в воздушно-сухом состоянии при температуре 4°C более 10 суток.

Модификация печатных электродов терморасширенным графитом

Китова А.Е., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.

Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

Модификация печатных электродов наноматериалами - нанотрубками, графеном, наночастицами золота широко используется для создания биосенсоров, биотопливных элементов [1]. Перспективным материалом для создания биоэлектродов является углеродный графеноподобный материал - терморасширенный графит (ТРГ). Терморасширенный графит представляет собой подвергнутый термообработке при температуре 900-1500°C окисленный графит. Материалы на основе ТРГ имеют высокую электропроводность, характеризуются биосовместимостью, химической устойчивостью в агрессивных средах и могут использоваться в течение длительного времени [2]. Электрохимические характеристики биоэлектродов на основе ТРГ и клеток *Gluconobacter* были представлены ранее в работе [3].

Целью работы являлась модификация печатных электродов терморасширенным графитом и исследование характеристик полученных электродов. В качестве биочувствительного материала, генерирующего сигнал, использовали бактериальные клетки *G. oxydans*.

Методика. На рабочем электроде печатного электрода (фирма “ЭЛКОМ”, Россия) прессованием закрепляли пластинку из ТРГ диаметром 3 мм и толщиной 0.05 мм. На рабочий электрод, покрытый ТРГ, наносили биомассу и высушивали при комнатной температуре. Измерения проводили в соответствии с методикой, представленной в работе [4]. Для регистрации сигналов электрода использовали гальванопотенциостат IPCmicro (ООО “Кронас”, Россия). Измерения проводили по трехэлектродной схеме. Хроноамперометрические зависимости регистрировали при потенциале 400 мВ относительно электрода сравнения. Циклические вольт-амперные характеристики (ЦВА) регистрировали при скорости сканирования потенциала 3 мВ/с в диапазоне от 600 до – 300 мВ. В качестве субстратов использовали глюкозу и этиловый спирт, медиатором являлся гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ). Для измерения импедансных характеристик электродов использовали гальванопотенциостат VersaSTAT 4 (Ametek Inc.). Спектральные импедансные характеристики электродов регистрировали в диапазоне частот от 40 кГц до 0.1 Гц с амплитудой 10 мВ при двух приложенных потенциалах 200 и 400 мВ.

Результаты. На рис. 1 приведены результаты потенциометрических измерений для печатных электродов, модифицированных ТРГ, и контрольного электрода без нанесения ТРГ. ЦВА характеристики для электродов, модифицированных ТРГ (кривые 2 и 3), имели

выраженные области окисления и восстановления медиатора при внесении субстратов (глюкозы или этилового спирта) в отличие от немодифицированного ТРГ (контрольного) электрода (кривая 1). Исследование чувствительности биосенсора при выборе в качестве субстрата этилового спирта показало, что данный параметр для модифицированного печатного электрода составлял 0.28 мкА/мМ, а для немодифицированного электрода – 0.084 мкА/мМ. При анализе глюкозы чувствительность модифицированного электрода составляла 0.15 мкА/мМ, что примерно в 2 раза меньше чувствительности к этиловому спирту.

Значения электрических сопротивлений и емкостей печатных электродов, модифицированных ТРГ и контрольных (без модификации ТРГ) получены методом электрохимической импедансной спектроскопии при приложенном к системе потенциале, равном 400 мВ. В отдельных экспериментах измерения проводили при потенциале 200 мВ. Из полученных данных следует, что увеличение амплитуды сигнала для электродов, модифицированных ТРГ, связано с уменьшением общего внутреннего сопротивления системы. Кроме того, увеличенная удельная емкость электродов, модифицированных терморасширенным графитом, может привести к увеличению нефарадеевского тока в системе, т.е. также влияет на рост амплитуды тока, протекающего через модифицированный ТРГ электрод.

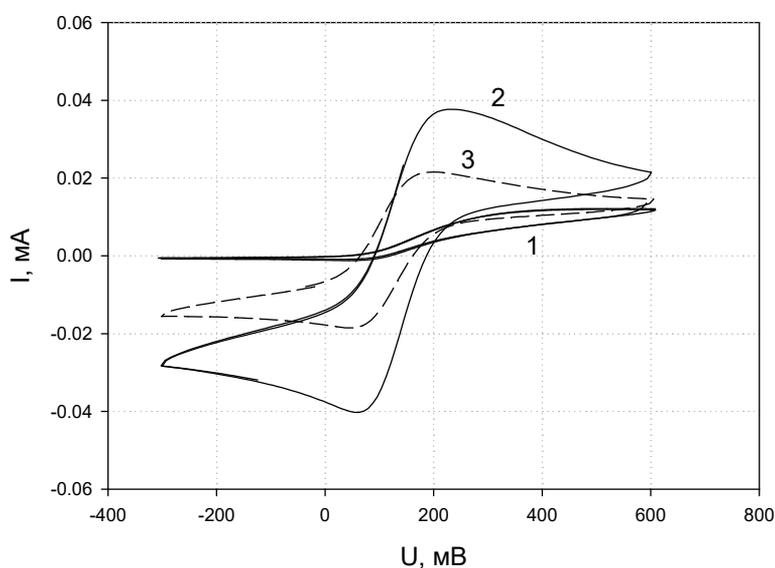


Рис. 1. Влияние ТРГ на генерацию сигнала при регистрации ЦВА характеристик для немодифицированного электрода (кривая 1, субстрат - этиловый спирт) и для модифицированных ТРГ электродов (кривая 2, субстрат – этиловый спирт и кривая 3, субстрат - глюкоза)

Таким образом, исследование нового типа электрохимического преобразователя – модифицированного терморасширенным графитом печатного электрода – показало, что биосенсоры, в которых используется такой преобразователь, имеют более высокую амплитуду сигнала, а вольт-амперные характеристики этих электродов имеют выраженные области окисления и восстановления (медиатора и субстрата). Чувствительность модифицированного биосенсора при анализе этилового спирта превосходила чувствительность немодифицированного биоэлектрода более чем в 3 раза. Результаты, полученные в работе, свидетельствуют в пользу целесообразности разработки

электрохимических преобразователей на основе печатных электродов, модифицированных терморасширенным графитом, для биосенсорных устройств.

Работа поддержана РФФИ 15-29-01292 ОФИ_М_2015 и Государственным заданием Минобрнауки РФ “Биосенсоры и биотопливные элементы на основе электродов, модифицированных нано-материалами” № 14.2094.2014.

Список литературы

1. Chan K.F., Lim H.N., Shams N., Jayabal S., Pandikumar A., Huang N.M. Fabrication of graphene/gold-modified screen printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen // *Materials Science and Engineering*. 2016. V. C 58. P. 666–674.
2. 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.
3. Reshetilov A.N, Kitova A.E, Kolesov V.V., Yaropolov A.I. Mediator-free bioelectrocatalytic oxidation of ethanol on an electrode from thermally expanded graphite modified by *Gluconobacter oxydans* membrane fractions // *Electroanalysis*. 2015. V. 27(6). P. 1443–1448.
4. Блохин И.В., Понаморева О.Н., Чупарнов А.А., Решетилов А.Н., Алферов В.А. Использование электродов, полученных трафаретной печатью и модифицированных берлинской лазурью и алкогольоксидазой, в биосенсорной системе для определения спиртов // *Известия ТулГУ. Серия Естественные науки*. 2008. Вып. 1. С. 177-181.

Особенности безмедиаторного переноса электронов клетками и мембранными фракциями бактерий *Gluconobacter oxydans*

**Тарасов С.Е.¹, Плеханова Ю.В.¹, Пташник И.В.²,
Быков А.Г.¹, Решетилов А.Н.¹**

¹ Лаборатория биосенсоров ИБФМ РАН

² Пуштинский государственный естественно-научный институт

Для работы большинства биоэлектрохимических систем необходимы дополнительные соединения, способные переносить свободные электроны, называемые медиаторами электронного транспорта. В настоящее время, наряду с медиаторным переносом электронов начинают эффективно применяться системы, не требующие применения медиатора. На возможность такого переноса влияют материал электрода, метод иммобилизации клеток, вид бактерий, или отдельных ферментов. Впервые явление безмедиаторного биоэлектрокатализа для фермента было обнаружено и исследовано на примере лактатоксидазы, при изучении реакции электрохимического восстановления кислорода. Поскольку многие БТЭ основаны на использовании микробных клеток, то этот же вопрос можно сформулировать как важный с точки зрения поиска условий безмедиаторного переноса для систем, содержащих микробные клетки. Для бактерий рода *Gluconobacter oxydans* безмедиаторный перенос обусловлен взаимодействием RQQ-зависимых дегидрогеназ этих клеток с глюкозой и этанолом на поверхности графена, содержащего нанотрубки и наночастицы.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка эффекта переноса электронов клетками бактерий *G. oxydans*, иммобилизованными на графитовом спектральном электроде без использования медиатора и в его присутствии, а также прямого переноса

электронов мембранными фракциями (МФ) *G. oxydans* на поверхности углеродного высокодисперсного материала (УВМ).

Анализ возможности прямого переноса электродов для целых клеток *G. oxydans* проводили по трехэлектродной схеме в кювете (2 мл), при pH 6.5. В качестве рабочего электрода применяли графитовый спектральный электрод, в качестве электрода сравнения выступал хлорсеребряный электрод и в роли вспомогательного использовали платиновый электрод.

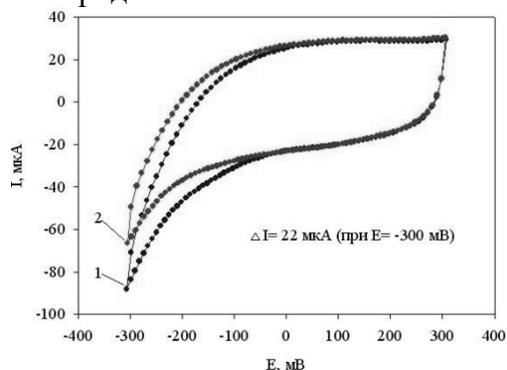


Рис. 1. ЦВА СГЭ с иммобилизованными в хитозане клетками: 1 – в буфере; 2 – после добавления субстрата (глюкоза, 10 мМ)

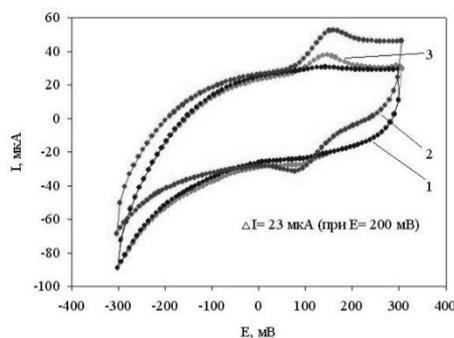


Рис. 2. ЦВА СГЭ, с иммобилизованными в хитозане клетками при добавлении медиатора. 1 – в буфере; 2 – после добавления субстрата (глюкоза, 10 мМ); 3 – после добавления медиатора (ДХФИФ, 42 мкМ)

Были получены вольтамперные характеристики электродов до и после внесения субстратов в измерительную ячейку. При введении в систему глюкозы (10 мМ), происходило увеличение токов окисления в отрицательной области подаваемых потенциалов (от минус 300 до минус 100 мВ) в отсутствие медиатора, и в положительной области (от плюс 100 до плюс 300 мВ) при сохранении подъема сигнала в отрицательном диапазоне потенциалов в присутствии медиатора (рис. 1-2). Максимальные амплитуды сигналов для безмедиаторного переноса заряда (19 мкА) наблюдали при подаваемом потенциале - 300 мВ, в то время как для медиаторного (13 мкА) при потенциале +300 мВ.

Для дальнейшего улучшения электрохимических параметров системы были сделаны следующие изменения – во-первых, спектральный графитовый электрод был заменен на УВМ, который по своим физическим и электрохимическим свойствам соответствовал всем требованиям к биоэлектродам. Кроме того, вместо целых клеток *G. oxydans* использовались их МФ, что должно было облегчить доступ субстратам к RQQ-зависимым дегидрогеназам.

Вольтамперные и хроноамперометрические характеристики для УВМ-электрода были получены по трехэлектродной схеме в ячейке объемом 5 мл. В ячейку с УВМ-электродом и иммобилизованными на нем МФ добавляли раствор этанола (10 мМ), а затем после установления уровня тока добавляли медиатор электронного транспорта – ДХФИФ (рис. 3). Амплитуда сигнала для прямого электронного переноса составила около 25 мкА, в то время как после добавления медиатора она увеличивалась до 210 мкА. Измерения при этом проводили при потенциале +200 мВ.

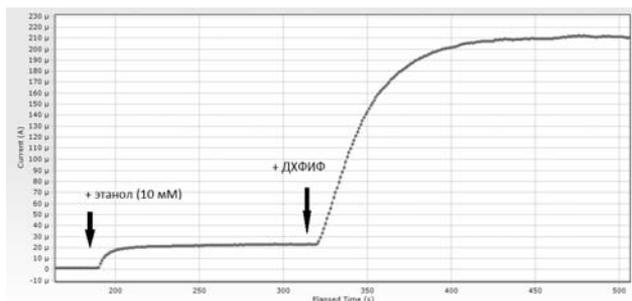


Рис. 3. Вид сигнала УВМ-электрода, содержащего клетки, на добавление субстрата (этанол, 10 мМ) и медиатора (ДХФИФ, 42 мМ).

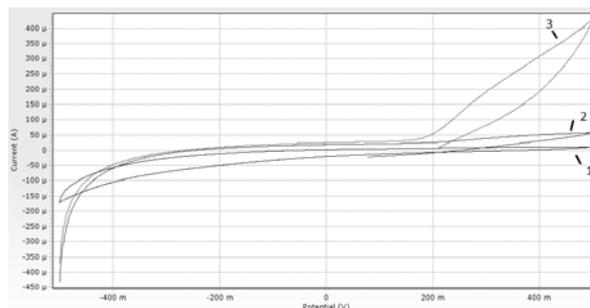


Рис. 4. Изменение ЦВА для УВМ, содержащего МФ в различных условия: 1 – в буфере; 2 — после добавления 10 мМ этанола; 3 - после добавления 10 мМ этанола и 42 мМ ДХФИФ

Для проверки наличия прямого переноса электронов в системе были сняты циклические вольтамперные характеристики для системы в буфере (рис. 4, кривая 1), системы после добавления 10 мМ этанола (рис. 4, кривая 2) и после добавления 42 мМ ДХФИФ (рис. 4, кривая 3). Вольтамперные характеристики показали отсутствие изменений в отрицательной области прикладываемых потенциалов при добавлении субстрата и медиатора, что доказывает, что основные процессы переноса электронов как в присутствии, так и в отсутствии медиатора проходят в области положительных потенциалов. Заметно увеличение анодных токов до 60 мкА в случае прямого электронного переноса и до 400 мкА при добавлении медиатора.

Таким образом, было показано наличие прямого электронного переноса в системах с целыми клетками и мембранными фракциями *G. oxydans*, что в дальнейшем может привести к созданию биосенсоров и биотопливных элементов по упрощенной методике без внесения дополнительных реагентов. Тем не менее, нельзя не отметить, что эффективность прямого электронного переноса пока что не превышает эффективность медиаторного.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-29-01292 ОФИ_М_2015).

Неорганические полифосфаты как важный компонент клеточной стенки при росте дрожжей *Candida maltosa* на гексадекане

Звонарев А.Н.¹, Рязанова Л.П.², Личко Л.П.², Русакова Т.Г.¹, Колесникова С.А.¹, Кулаковская Т.В.², Дмитриев В.В.¹

¹ ВНТК трехмерных структур микроорганизмов ИБФМ РАН

² Лаборатория регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН

Потребление гексадекана(НД) дрожжами *Candida maltosa* (ВКМ -2359) сопровождается увеличенным содержанием длинноцепочечных полифосфатов (PolyP). При этом особая роль принадлежит PolyP клеточной стенки. Разрушение этих полиР с помощью дрожжевой полифосфатазы (PPX1) приводит к структурным изменениям в клеточной стенке. Методами флуоресцентной и электронной микроскопии была показана

деструкция каналов, содержащих окислительные ферменты, ответственные за первичные этапы утилизации гексадекана.

Формирование каналов в дрожжевой клеточной стенке представляет собой уникальную модель функционирования эукариотной клетки. Нами было показано, что каналы образуются в клеточной стенке при росте на гидрофобных субстратах и в условиях голодания [Dmitriev et. al. 2011]. Каналы при росте на гидрофобных субстратах приобретают липофильность и оснащаются окислительными ферментами. Формирование «каналов» коррелирует с повышением активности гидролаз полисахаридов клеточной стенки: β -glucosidase, β -glucanase и α -mannosidase и модификацией основных полисахаридов: глюкоана и маннана [Dmitriev et. al. 2016]. Акцент был сделан на неорганические полифосфаты, как наименее изученные биополимеры клеточной оболочки.

В данной работе было показано, что при потреблении HD клетки *S. maltosa* накапливают намного больше PolyP, чем при потреблении глюкозы (табл 1). Этот эффект наблюдался также и на среде с низким содержанием Pi (неорганических фосфатов).

Таблица 1

Характеристики роста и содержание минеральных фосфорных соединений у *S.Maltosa* в средах с глюкозой и гексадеканом

Состав среды культивирования	Продолжительность лаг фазы, час	Скорость роста в лог фазе, μ (час ⁻¹)	Общее содержание PolyP, мкмоль P/г сухой биомассы
Глюкоза 10 mM Pi	1,25	1,02	73
Гексадекан 10 mM Pi	4,25	0,58	200
Глюкоза 0,16 mM Pi	2,75	0,72	2,5
Гексадекан 0,16 mM Pi	6,0	0,50	16

На Рис.1 показаны клетки окрашенные DAPI и выращенные на различных источниках углерода. Клетки, выращенные в среде с гексадеканом (Рис.1д), интенсивней окрашиваются DAPI, чем клетки, выращенные на глюкозе (Рис.1г), что согласуется с большим содержанием в них PolyP. В этих клетках выявляется значительное количество полиР в КС. Это позволило нам предположить особую роль PolyP в клеточной стенке дрожжей при потреблении HD.

Полифосфатаза PPX1 является высокоспецифичным ферментом по отношению к полиР и может служить инструментом для выявления локализации полиР в клеточной стенке. Клеточная стенка, обработанная PPX1 и окрашенная DAPI отличается дискретным характером флуоресценции и при этом исчезает характерное для PolyP оранжевое свечение (Рис.1е).

Электронная сканирующая микроскопия показала, что каналы (обычно размером 176 ± 8 нм) после обработки полифосфатазой лишились части своих компонентов и уменьшились в размерах (Рис.1б) при сравнении с нативными клетками (95 ± 13 нм) (Рис.1в).

Таким образом, мы предполагаем, что полифосфаты клеточной стенки играют важную роль в структурно-функциональной организации каналов клеточной стенки *S. Maltosa*. Дальнейшее исследование «каналов» дрожжей может помочь расширить понимание значимости этих сложных в функциональном плане структур.

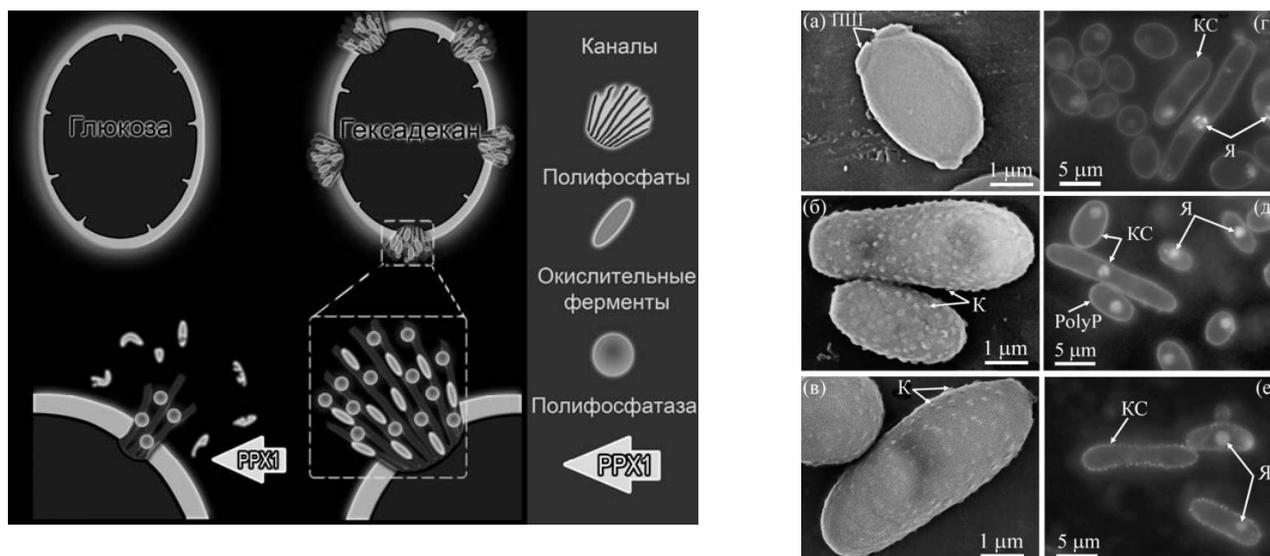


Рис.1. Сканирующая электронная микроскопия клеток *C. maltosa*, выращенных на глюкозе (а) и HD(б). Клетки, выращенные на HD, обработанные PPHI(в). К – каналы, ПШ – почечные шпалы. Цитохимическое окрашивание DAPI не выявляет полифосфатные образования (оранжевая флуоресценция) в клеточной стенке *C. maltosa* при росте на глюкозе(г) и выявляет при росте на HD(д). Окрашивание DAPI клеток, выращенных на HD и обработанных PPHI(е). КС – клеточная стенка, Я – ядро

При поддержке РФФИ, грант 16-04-00396 А «Структурно-функциональные перестройки клеточной оболочки дрожжей при адаптации к потреблению углеводов и голоданию».

Список литературы

1. Dmitriev V., Crowley D., Rogachevsky V., Negri C. M., Rusakova T., Kolesnikova S & Akhmetov L / Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media// FEMS microbiology letters 2011, 315(2), 134-140.
2. V. Dmitriev, D. Crowley, A. Zvonarev, T. Rusakova, M. Negri and S. Kolesnikova/ Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions// Yeast 2016; 33: 55–62
3. T. Kulakovskaya, L. Ryasanova, V. Dmitriev and Anton Zvonarev/ The Role of Inorganic Polyphosphates in Stress Response and Regulation of Enzyme Activities in Yeast// in book Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells, Springer, 2016, DOI 10.1007/978-3-3-319-41073-9_1
4. Ryazanova, L., Zvonarev, A., Rusakova, T., Dmitriev, V., & Kulakovskaya, T./Manganese tolerance in yeasts involves polyphosphate, magnesium, and vacuolar alterations./ / *Folia microbiologica*, (2016) 61:311–317
5. Zvonarev A, Crowley D, Ryazanova L, Lichko L, Rusakova T, Kolesnikova S, Kulakovskaya T, Dmitriev V./ Inorganic polyphosphate is an essential component for the hexadecane consumption by *Candida maltosa*// *FEMS Yeast Research* 2016 (in press).

**Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии
в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения
для контроля этапов трансформации нафталина
и фенантрена ризосферными бактериями
*Pseudomonas aureofaciens***

**Зякун А.М.¹, Кочетков В.В.², Захарченко В.Н.¹, Баскунов Б.П.¹, Пешенко В.П.¹,
Лауринавичюс К.С.¹, Сиунова Т.В.², Анохина Т.О.², Боронин А.М.²**

¹ Лаборатория масс-спектрометрии ИБФМ РАН

² Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН

Масс-спектрометрический анализ был использован для контроля метаболитов в культуральной среде при биodeградации нафталина и фенантрена ризосферными бактериями.

Проведено определение метаболитов у штамма BS1393(pOV17), содержащего природную плазмиду биodeградации нафталина pOV17, детерминирующую полное окисление нафталина и штамма BS1393(NPL-41), содержащего мутантную плазмиду NPL-41, контролирующую только первичные этапы окисления нафталина до салициловой кислоты.

Как с нафталином так и с фенантеном во втором случае показано накопление салициловой кислоты с м.в. 138 (с m/z 137). В то же время при росте штамма BS1393(pOV17) салициловая кислота полностью отсутствовала, что указывает на полное окисление субстрата этим штаммом. Повышенное накопления промежуточных метаболитов позволяет также идентифицировать лимитирующие стадии процесса биodeградации у бактерий.

Научное издание

**III ПУЩИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ
РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»**

5-9 декабря 2016

Материалы конференции

Авторское редактирование

Подписано в печать 01.12.16.
Формат бумаги 70x100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 19,04. Уч.-изд. л. 10,8.
Тираж 70 экз. Заказ

Отпечатано в типографии «Юлис».
г. Тамбов, ул. Монтажников 9
г. Москва, ул. Гостиничный проезд, 4б, подъезд 3 «а»