

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

АНО Исследовательский центр «Биоресурсы и экология»

V ПУЩИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»

3-7 декабря 2018

Материалы конференции



Пушино
2018



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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом
и издаются в авторской редакции

V Пушкинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: [сборник тезисов]. — Москва : Издательство Вода: химия и экология, 2018. — 176 с.

ISBN 978-5-9909335-6-9

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

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

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

Подписано в печать 01.12.18.
Формат бумаги 70x100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Тираж 50 экз. Заказ .

Отпечатано в ООО «Принтэлит»
127106, г. Москва, Гостиничный проезд, д. 4Б
тел.: +7 (495) 668-09-42
e-mail: info@printelit.ru
www.printelit.ru

УДК ?



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

АНО Исследовательский центр «Биоресурсы и экология»

**V Пущинская школа-конференция
«Биохимия, физиология и биосферная
роль микроорганизмов»**

3-7 декабря 2018

Материалы конференции

Пущино – 2018

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

V Пушчинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»:
сборник тезисов. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2018.

ISBN 978-5-9909335-6-9

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

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

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

Подписано в печать 01.12.18.
Формат бумаги 70x100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Тираж 50 экз. Заказ .

Отпечатано в ООО «Принтэлит»
127106, г. Москва, Гостиничный проезд, д. 4Б
тел.: +7 (495) 668-09-42
e-mail: info@printelit.ru
www.printelit.ru

Содержание

Закономерности комбинированного действия кадмия и лития на дрожжевые клетки <i>Афонин А.А., Ляпунова Е.Р., Комарова Л.Н.</i>	9
Структурно-функциональные исследования рекомбинантной сульфатазы из <i>Fusarium proliferatum</i> LE1 <i>Бобров К.С., Колчина Н.В., Петухов М.Г., Рычков Г.Н., Кульминская А.А.</i>	11
Биохимический анализ при оценке эффективности рекультивации нарушенных тундровых почв <i>Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Башкин В.Н.</i>	13
Фотоавтотрофные культуры <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : дефицит серы, анаэробизм и образование водорода <i>Гречаник В.И., Цыганков А.А.</i>	15
Инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы для применения в фаговой терапии <i>Ким А.Л., Дубровский А.В., Мусин Е.В., Арискина Е.В., Кудряшова Е.Б., Тихоненко С.А.</i> ...	16
Конструирование рекомбинационных кассет для создания вируса АЧС с делецией гена А224L <i>Кольцова Г.С., Малоголовкин А.С.</i>	17
Влияние композитного сорбента и биопрепарата «Деворойл» на скорость детоксикации серой лесной почвы, загрязнённой нефтью <i>Кондрашина В.С., Стрижакова Е.Р., Васильева Г.К.</i>	19
Образование биопленок патогенных микроорганизмов в присутствии гидрозоль железа(III) <i>Леонова Л.В., Черепанов Д.В., Леонов В.В., Соловьев В.Г.</i>	21
Влияние персистенции <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> на состояние перекисного окисления липидов и глутатион-зависимой системы в эритроцитах крови детей <i>Носарева О.Л., Степовая Е.А., Помогаева А.П., Шахристова Е.В.</i>	22
Особенности выделения водорода у мутантов <i>Anabaena</i> PCC 7120 с модифицированной нитрогеназой в отсутствие Nip гидрогеназы <i>Романова А.И., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А.</i>	24
Влияние синтетических поверхностно-активных веществ на бактерии рода <i>Azotobacter</i> <i>Симакова В.С.</i>	26
Доля фагов Т4-типа среди колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни <i>Скобляков Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Зимин А.А.</i>	27
Определение генов с высокой дифференциальной экспрессией при индукции ацетатом кортизона у штамма <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д <i>Фокина В.В., Брагин Е.Ю., Шутков А.А., Донова М.В.</i>	29
Изучение способов стабилизации мембранных белков на примере реакционного центра пурпурной бактерии <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Габдулхаков А.Г., Шувалов В.А.</i>	31
Бактерии рода <i>Vacillus</i> : роль в природе и области применения человеком <i>Черепанова Е.А., Латыпова Г.Ю., Максимов И.В.</i>	32
Транскрипционная и трансляционная регуляция гена холина бактериофага Т5 <i>Чернышов С.В., Масулис И.С., Шадрин В.С., Микулинская Г.В.</i>	34
Исследование спектра бактериолитического действия пептидогликангидролаз колифагов Т5, RB43 и RB49 <i>Шадрин В.С., Чернышов С.В., Дорофеева Л.В., Микулинская Г.В.</i>	36

Влияние ионов металлов на обесцвечивание трифенилметановых красителей бактериями рода <i>Azospirillum</i> <i>Шатерников А.Н., Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е.</i>	39
Таксономическая структура бактериальной компоненты микробного сообщества промышленной биогазовой установки на двух стадиях сбраживания сложного субстрата <i>Яценко В.А., Ключева В.В., Ходжаев Ю.Р., Бояршин К.С., Мейлах И.К., Бредихин В.П., Батлуцкая И.В.</i>	40
Выщелачивание металлов из стекловидных шлаков силикатными бактериями <i>Абашина Т.Н., Делеган Я.А., Яцкив А.А., Вайнштейн М.Б., Kumar S.</i>	42
<i>Hansschlegelia quercus</i> sp. nov. - новый вид аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов <i>Агафонова Н. В., Капаруллина Е. Н., Доронина Н. В.</i>	44
Роль неорганических полифосфатов в устойчивости дрожжей к тяжелым металлам <i>Андреева Н.А., Рязанова Л.П., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Ледова Л.А., Кулаковская Т.В.</i>	46
Характеристика ризосферных бактерий, выделенных из нефтезагрязненной почвы Нефтеюганского района <i>Анохина Т. О., Сазонова О. И., Соколов С. Л., Сизова О. И., Сиунова Т. В., Кочетков В. В.</i>	47
Метаболизм нафталина у таксономически удаленных штаммов-деструкторов <i>Rhodococcus</i> sp. O539F и <i>Pseudomonas chlororaphis</i> OV17(pOV17) <i>Анохина Т.О., Есикова Т.З., Соляникова И.П.</i>	49
Вторичные метаболиты грибов рода <i>Penicillium</i> , выделенных из различных экосистем высоких широт <i>Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Озерская С.М., Козловский А.Г.</i>	50
Образование новых клеточных ультраструктур в стрессовом ответе дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Аринбасарова А.Ю., Мачулин А.В., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г., Сузина Н.Е.</i>	52
Аурофузарин — внутриклеточный димерный нафтохинон гриба <i>Fusarium decemcellulare</i> <i>Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г.</i>	54
Дыхательные редуктазы <i>Dtnitrovibrio Acetiphilus</i> <i>Архипова О. В., Абашина Т. Н., Хохлова Г. В., Микулинская Г. В.</i>	56
Локализация редуктазных активностей у анаэробов-носителей метакрилатной редокс системы <i>Архипова О.В., Бирюкова Е.Н., Хохлова Г.В., Абашина Т.Н., Ашин В.В., Микулинская Г.В.</i>	58
Аффинная очистка рекомбинантной метакрилатредуктазы <i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1 на сорбентах с триазиновыми красителями <i>Архипова О.В., Захарова М.В., Микулинская Г.В.</i>	60
Выделение и характеристика β - литической протеазы <i>Lysobacter capsici</i> <i>Афошин А.С., Кудрякова И.В., Шишкова Н.А., Торопыгин И.Ю., Васильева Н.В.</i>	62
Новый вид актинобактерий <i>Haloactinopolyspora antiqua</i> sp.nov. <i>Барышникова Л.М., Автух А.Н., Арискина Е.В., Винокурова Н.Г., Дорофеева Л.В., Мачулин А.В., Евтушенко Л.И.</i>	63
Антиоксидантные системы и стресс у дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Бирюкова Е. Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i>	65

Изучение генов деградации стероидных соединений у штамма <i>Mycobacterium</i> sp. ВКМ Ас-1817Д — продуцента 9 α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-диона с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК <i>Брагин Е.Ю., Довбня Д.В., Штратникова В.Ю., Щелкунов М.И., Донова М.В.</i>	67
Функции ферментов серинового цикла ассимиляции формальдегида у метанотрофов I типа <i>Бут С.Ю., Егорова С.В.</i>	69
Микроорганизмы с фенолдеградирующими свойствами из очистных сооружений <i>Быков А.Г., Кувичкина Т.Н., Носулич В.Е., Макаренко А.А., Решетилов А.Н.</i>	71
Глюкоза вызывает первичный некроз в клетках <i>Saccharomyces cerevisiae</i> находящихся в логарифмической стадии роста <i>Валиахметов А.Я., Звонарёв А.Н., Сузина Н.Е.</i>	72
Развитие концепции баркодинга грибов <i>Василенко О.В., Иванушкина Н.Е., Стародумова И.П., Кочкина Г.А., Данилогорская А.А., Пинчук И.П., Телков М.В., Озерская С.М.</i>	73
Изучение физиологии роста и экспрессии генов штамма <i>Gordonia</i> sp. 1D при культивировании на средах с углеводородами <i>Ветрова А.А., Делеган Я.А., Позднякова-Филатова И.Ю.</i>	76
Изучение факторов, повышающих стабильность микроорганизмов рода <i>Pseudomonas</i> к воздействию экстремальных факторов внешней среды <i>Ветрова А.А., Якшина Т.Е., Филонов А.Е., Самойленко В.А.</i>	78
Нетипичная грибная лакказа <i>Гайдина А.С., Мясоедова Н.М., Черных А.М., Головлева Л.А., Коломыцева М.П.</i>	79
<i>Paracoccus yeeyii</i> — изолят из зеленого чая <i>Доронина Н. В., Капаруллина Е. Н.</i>	80
Характеристика глюкозо-1 дегидрогеназ у нерастущих на сахарах метанотрофных бактерий <i>Егорова С.В., Бут С.Ю., Мустахимов И.И.</i>	83
Сравнительная характеристика ключевых ферментов серинового цикла у метанотрофов реализующих различные пути C1-ассимиляции <i>Егорова С. В., Бут С. Ю.</i>	84
Влияние промотора гена метанолдегидрогеназы на светимость аэробных метилотрофных бактерий, меченных зеленым флуоресцентным белком <i>Екимова Г.А., Агафонова Н.В., Фирсова Ю.Е.</i>	85
Выявление генов и филогенетический анализ ферментов катаболизма 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина у представителей родов <i>Methylobacterium</i> и <i>Methylobacterium</i> <i>Екимова Г.А., Доронина Н.В.</i>	87
Идентификация генов катаболизма <i>epsilon</i> -капролактама, локализованных на САР плазмиде pBS270 <i>Есикова Т.З.</i>	89
Биодеградация грибами образцов поликапролактона и полилактида <i>Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зайцев К.В., Недорезова Р.М., Аладышев А.М., Клямкина А.Н., Костюк С.В., Данилогорская А.А., Козловский А.Г.</i>	91
Новые психрофильные бактерии и определение их способности к трансформации стерина и холевых кислот <i>Замалутдинова С.В., Трубицын В.Э., Децереvская Н.О., Донова М.В., Щербакова В.А.</i>	93

Гетерологичная экспрессия генов анаэробной метакрилатной редокс системы <i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1 Захарова М.В., Микулинская Г.В., Архипова О.В.	95
<i>Trichococcus psychrophilus</i> sp. nov. — новая факультативно анаэробная бактерия, выделенная из железовосстанавливающего микробного сообщества холодного минерального источника Захарюк А.Г., Щербакова В.А.	97
Оригинальный методический подход для получения чистых фракций вещества каналов — уникальных структур клеточной стенки дрожжей при росте на углеводородах Звонарев А.Н., Фарафонова В.В., Русакова Т.Г., Дмитриев В.В.	99
Обнаружение I-форм P _f -подобных бактериофагов в лизатах <i>P. aeruginosa</i> РАОІ экстрактами фекалий зубров Зимин А. А., Никулин Н.А., Скобликов Н.Э., Сузина Н.Е.	101
Влияние натуральных сорбентов и биопрепарата «Микробак» на скорость биоремедиации серой лесной почвы, загрязненной углеводородами нефти Зиннатшина Л.В., Ахметов Л.И., Филонов А.Е., Стрижакова Е.Р., Васильева Г.К.	103
Анализ устойчивости к лекарственным препаратам штаммов, изолированных с детских площадок г. Пушкино Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Дымова Е.А., Винникова К.С., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Кошелева И.А.	105
Влияние внутригенных антисмысловых промоторов на регуляцию экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции системы рестрикции-модификации II типа EcoRI Казанцева О.А., Нагорных М.О., Захарова М.В.	107
Факультативный метилотроф <i>Ancylobacter</i> sp. Gurmol - холобионт моллюска <i>Donax trunculus</i> L. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.	109
Распространение резистентных микроорганизмов и детерминант устойчивости к антибиотикам в очистных сооружениях г. Пушкино Кошелева И.А., Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Сиунова Т. В., Гафаров А.Б., Соколов С.Л.	111
Анализ экспрессии гена <i>segB</i> в ходе инфекционного цикла фага T4 Кузницын Р.А., Григорьева Т.Ю., Макарова А.О., Майоров С.Г., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И. Э.	112
Взаимодействие целлюбиозо дегидрогеназы гриба <i>Cerrena unicolor</i> с гуминовыми кислотами Лисов А.В., Белова О.В., Лисова З.А., Заварзина, А.Г., Леонтьевский А.А.	113
Трансформация С-19, С-21 стероидов и холевых кислот <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В.	114
Экспрессия протеазы S273R вируса АЧС в клетках <i>E.coli</i> и схема получения растворимого препарата Майоров С.Г., Латыпов О.Р., Зражаева Д.С., Холод Н.С., Зайчик Б.Ц., Шляпников М.Г., Грановский И. Э.	116
Влияние биоэнергетических характеристик метаболизма клеток на выход биомассы из субстрата Минкевич И.Г.	117
Испытание препарата изолимонной кислоты в модели окислительного стресса, индуцированного тяжелыми металлами на инфузории <i>Paramecium caudatum</i> Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Самойленко В.А., Карпущина О.В., Иноземцев А.Н.	119

Эффективность промоторов <i>B. cereus</i> ATCC4342, контролируемых системой quorum sensing PlcR-PapR <i>Нагель А.С., Казанцева О.А., Кузницын Р.А., Шадрин А.М.</i>	121
Индукция синтеза карбогидраз гриба <i>Penicillium verruculosum</i> гентибиозой <i>Немашкалов В.А., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В.</i>	122
Оптимизация условий культивирования грибного штамма <i>Penicillium verruculosum</i> F10, продуцента β-глюкозидазы <i>Немашкалов В.Н., Бубнова Т.В., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Сеницын А.П.</i>	124
Психрофильные метаногенные археи из вечной мерзлоты Арктики <i>Ошуркова В.И., Ривкина Е.М., Щербакова В.А.</i>	125
Вклад бактерий в поглощение микроэлементов бентонитом <i>Переломов Л.В., Сизова О.И.</i>	127
Параметры электрохимического глюкозного биосенсора при иммобилизации фермента в полиэлектролитные капсулы <i>Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н.</i>	129
Анализ регуляторной области генов деструкции нафталина и салицилата микроорганизмов рода <i>Pseudomonas</i> <i>Позднякова-Филатова И.Ю., Фролова А.А., Скулкина К.М., Захарова М.В.</i>	131
Проблема количественной оценки жизнеспособности микроорганизмов: status quo <i>Пучков Е.О.</i>	132
Изучение пути деградации эктоина у <i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z <i>Решетников А.С., Мустахимов И.И., Хмеленина В.Н.</i>	135
Роль малик-фермента в метаболизме облигатных метанотрофов I и II типов <i>Розова О.Н., Хмеленина В.Н.</i>	136
<i>Desulfovibrio gilchinskyi</i> sp. nov.: описание нового вида с применением данных геномного анализа <i>Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.</i>	138
Сравнительный анализ противоопухолевой активности монасникатиновой кислоты, нового метаболита из серии аусталидов и полимера гентиизиновой кислоты <i>Рыццов Г. К., Антипова Т.В., Лисов А.В., Земскова М.Ю.</i>	140
Особенности экспрессии генов двухдоменных бактериальных лакказ в векторе pQE-30 <i>Свиридов А.В., Трубицин И.В., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.</i>	142
Систематика рода <i>Clavibacter</i> <i>Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Тарлачков С.В., Дорофеева Л.В., Василенко О.В., Евтушенко Л.И.</i>	143
Исследование влияние цинка на биосинтез липидов <i>Torulaspora globosa</i> <i>Степанова Н.Н., Миронов А.А., Аллаяров Р.К., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.</i>	146
Конструирование магнитотактных наноконтейнеров из клеток грамположительных кокковидных ультрамикробактерий <i>Сузина Н.Е.1, Абашина Т.А.1,2, Мачулин А.В.1, Полищцева В.Н.1, Шорохова А.П.1, Есикова Т.З.1, Сорокин В.В.3, Дуда В.И.1,2.</i>	148
Двухстадийное получение тестостерона из фитостерина с применением штаммов <i>Mycobacterium neoaurum</i> ВКМ Ас-1815Д и <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д <i>Текучева Д.Н., Суходольская Г.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутков А.А., Донова М.В.</i>	150

Нарушение регуляции Pma1 H ⁺ -АТФазы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> вызывает перераспределение фракций неорганических полифосфатов Томашевский А.А., Петров В.В.	152
Метаболический потенциал <i>Sphaerochaeta associata</i> на основе анализа генома Трошина О.Ю., Ошуркова В., ЩербакOVA В.А.	155
Разнообразие нефтеокисляющих микроорганизмов из почв Западной Сибири Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ветрова А.А., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кинжаев Р. Р., Трофимов С.Я.	157
Влияние лигнина на эффективность очистки почвы от углеводов нефти с использованием биопрепарата «Микробак» Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Ветрова А.А., Фунтикова Т.В., Почуев В.А., Алехин Р.С.	159
Клонирование промотора гена лантан-зависимой метанолдегидрогеназы <i>hoxF</i> <i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> DM4 Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.	161
Активация модифицированной про-каспазы-3 свиньи протеазой S273R вируса АЧС в клетках млекопитающих Холод Н.С., Безлепкина Т.А., Майоров С.Г., Кузницын Р.А., ПересадиНА А.В., Шляпников М.Г., Грановский И. Э.	163
Влияние циклодекстринов на региоселективное окисление грибной лакказой 3Я-гидрокси-Δ ⁵ -андростена и его 7α- и 7β- гидроксИ производных Хомутов С.М., ШутОВ А.А., Донова М.В.	164
Штамм <i>Serratia</i> sp. ASf1, устойчивый к высоким концентрациям железа (III) Хохлова Г.В., Филатова И.Ю., Лауринавичус К.С., Вайнштейн М.Б.	165
<i>Ancylobacter lacus</i> sp.nov. — новый вид аэробных метилотрофных бактерий из пресного озера Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.	167
Активный продуцент голубых оксидаз — аскомицет <i>Thielavia ovispora</i> Шебанова А.Д., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Головлева Л.А., Коломыцева М.П.	169
Изучение сортов ржи на устойчивость к спорынье <i>Claviceps purpurea</i> (FR.) TUL. и содержания эргоалкалоидов в образцах склеротий зерновых культур, собранных на территории Кировской области Шешегова Т.К., Щеклеина Л.М., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Козловский А.Г.	170
О роли гумусовых веществ в процессе биологической деструкции нефтезагрязнений Шкидченко А.Н., Ахметов Л.И.	172
Сравнительная характеристика фосфоноацетальдегид гидролаз у почвенных бактерий рода <i>Achromobacter</i> Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.	174

Закономерности комбинированного действия кадмия и лития на дрожжевые клетки

Афонин А.А., Ляпунова Е.Р., Комарова Л.Н.

Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск, lyapunovae@gmail.com

В настоящее время использование аккумуляторов становится всё более частым явлением, они применяются как в повседневной жизни – в телефонах, ноутбуках и других персональных устройствах, в медицине, сельском хозяйстве и, несомненно, в транспорте. Одним из крупных потребителей являются российские железные дороги [1].

Одними из самых широко используемых типов аккумуляторов, помимо кислотных, являются литий-ионные (Li-Ion), литий-полимерные (Li-Pol) и никель-кадмиевые (Ni-Cd), содержащие в составе своих электродов кадмий и литий. В связи с тем, что в большинстве случаев израсходовавшие свой ресурс аккумуляторы утилизируются как бытовые отходы, их не перерабатывают, а захоранивают на полигоне с тоннами других отходов, оттого загрязнение ими окружающей среды делают исследование влияний этих металлов крайне актуальным.

Объектом исследования в данной работе являлись дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа – дикий диплоидный штамм XS800.

Выбор объекта исследования обусловлен тем, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются перспективным объектом для биотестирования. Помимо высокой чувствительности к внешним воздействиям, дрожжи, являясь одноклеточными эукариотными организмами, характеризуются высокой степенью гомологичности с высшими эукариотами и являются наиболее изученным модельным организмом, на примере которого происходит исследование эукариотических клеток. Кроме того, дрожжи характеризуются быстрым ростом на плотной питательной среде, а простота их культивирования обеспечивает четкую воспроизводимость результатов.

Перед началом эксперимента дрожжевые клетки культивировали на скошенном слое твердой питательной среды при температуре 30°C в течение 5-6 суток для достижения ими стационарной стадии роста. Для культивирования использовали среду Сабуро.

Основываясь на гигиенических нормативах ГН 2.1.7.2042-06 ОДК кадмия в почве была принята за 1,5 мг/кг [2]. В связи с отсутствием предельно допустимой концентрации (ПДК) лития в почве, было решено использовать значение ПДК для водных объектов. Основываясь на гигиенических нормативах ГН 2.1.5.1315-03 ПДК лития была принята за 0,03 мг/л [3].

На рис. 1 представлены эффекты влияния кадмия (А) и лития (Б) в концентрациях 1 ОДК (1,5 мг/кг) и 1 ПДК (0,03 мг/л) соответственно на выживаемость дрожжей.

Из приведенных данных видно, что выживаемость клеток относительно контроля существенно снижается уже при получасовом воздействии кадмия. Среднетоксичное время воздействия составило 7,3 мин. Полученные данные хорошо сочетаются с данными представленными другими авторами [4; 5] по токсичности кадмия.

Воздействие лития менее губительно по сравнению с кадмием: при тридцатиминутном воздействии наблюдается сохранение выживаемости больше половины особей. Среднетоксичное время действия ионов лития составило 39,7 мин.

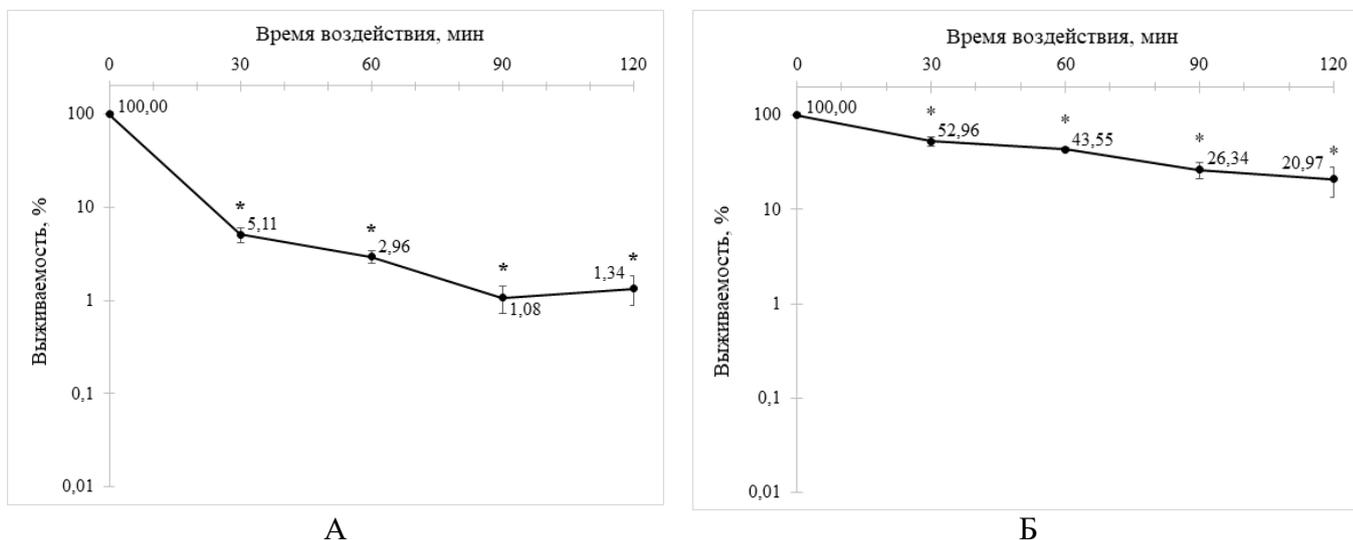


Рис. 1 – Зависимость выживаемости дрожжей от времени воздействия 1 ОДК кадмия (А) и 1 ПДК лития (Б)

Комбинированное воздействие металлов на дрожжевые клетки и изменение их выживаемости отображено на рис. 2. Для понимания механизма комбинированного действия металлов на дрожжевые клетки была построена теоретическая кривая выживаемости для комбинации металлов, соответствующая независимому сложению их эффектов.

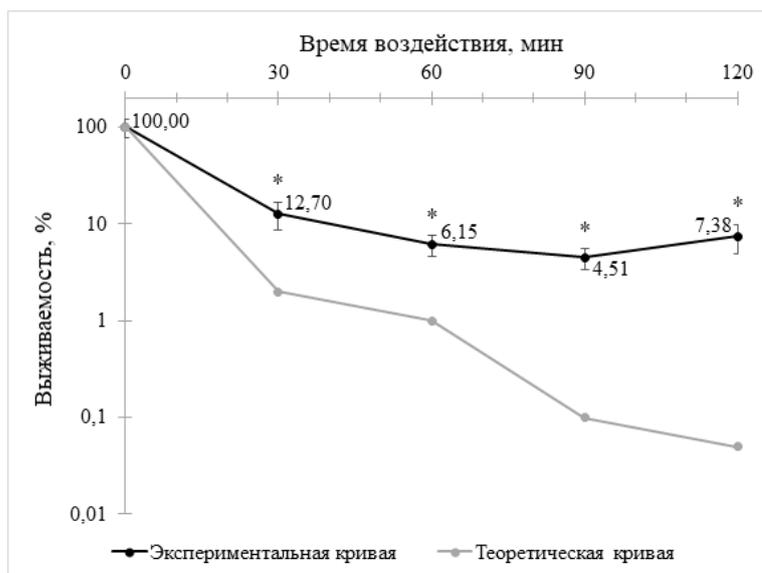


Рис. 2 – Зависимость выживаемости дрожжей от времени комбинированного воздействия 1 ОДК кадмия и 10 ПДК лития

Из рис. 2 видно, что теоретическая кривая на всем протяжении действия проходит ниже, чем экспериментальная, из чего можно сделать предположение, что литий оказывает антагонистическое действие относительно кадмия и помогает клеткам справиться с его токсичностью.

В ходе исследования была проведена оценка токсичности и угнетающего действия таких металлов, как кадмий и литий на выживаемость дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Изолированное воздействие каждого из металлов негативно сказалось на выживаемости, а при комбинированном воздействии металлами обнаружено, что литий повышает резистентность клеток по отношению к кадмию.

Литература

1. Иванова, Е.А., Бельков, В.М. Эксплуатация и утилизация никель-кадмиевых аккумуляторов // Вестник научно-исследовательского института железнодорожного транспорта. 2011. №2. С.32-34.
2. ГН 2.1.7. 2511-09. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве. Взамен ГН 2.1.7.2042-06; введ. 01.07.2009. Москва: Федеральный центр Роспотребнадзора, 2009, С.6
3. ГН 2.1.5.1315-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – Взамен ГН 2.1.5.689-98; введ. 27.04.2003. Москва: Минздрав России, 2003. С.59.
4. Богачева, А.С., Шилов, В.В. Полозова, Е.В. Чувствительность цианобактерий *Synechocystis* sp. к токсическому действию солей тяжелых металлов // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: Тезисы докладов Российской научной конференции с международным участием. Санкт-Петербург, 2011. С.26.
5. Маячкина, Н.В. и др. Изменение токсичности почв, загрязненных кадмием в полевом модельном опыте / Маячкина Н.В., Дроздова И. В., Бакина Л.Г., Поляк Ю.М. // Материалы I Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции. Симферополь, 2017. С.161-166.

Структурно-функциональные исследования рекомбинантной сульфатазы из *Fusarium proliferatum* LE1

*Бобров К.С.¹, Колчина Н.В.^{1,2}, Петухов М.Г.^{1,2}, Рычков Г.Н.^{1,2},
Кульминская А.А.^{1,2}*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова научно-исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург
bobrov_ks@pnpi.nrcki.ru

Сульфатазы (КФ 3.1.6.-) относятся к ферментам класса гидролаз, катализирующим гидролиз эфиров серной кислоты. Известно, что эти ферменты обладают широким спектром биологических активностей [1] и вовлечены в патогенез многих заболеваний [2, 3]. Также сульфатазы играют важную роль в росте и морфологии грибов рода *Fusarium*, что делает их потенциальной мишенью для разработки новых фунгицидов [4]. Тем не менее, количество охарактеризованных сульфатаз крайне мало. Наиболее изучены человеческие ферменты, в то время как микробным сульфатазам уделялось мало внимания.

Существующие в природе сульфатазы можно разделить на четыре семейства [5]. Однако подавляющее большинство этих ферментов являются представителями одного семейства — формилглицин содержащих сульфатаз (FGly-сульфатаз) [5]. FGly-сульфатазы содержат уникальный аминокислотный остаток S α -формилглицин (FGly), образующийся в результате пост-трансляционной модификации консервативного остатка серина или цистеина. Данная модификация происходит перед процессом фолдинга белка, и для её осуществления необходимо наличие консервативного мотива (C/S)-x-P-x-R, находящегося на N-конце фермента [1,5]. Было предложено два возможных механизма реакции гидролиза сульфозэфиров, катализируемой FGly-сульфатазами (Рисунок 1), отличающихся активной формой FGly [6]. При этом считается, что ферменты, не подвергшиеся пост-трансляционной модификации и, следовательно, не имеющие FGly, не

способны катализировать реакцию гидролиза. Такие белки образуют ковалентно связанный комплекс с субстратом, не претерпевающий дальнейших изменений [6].

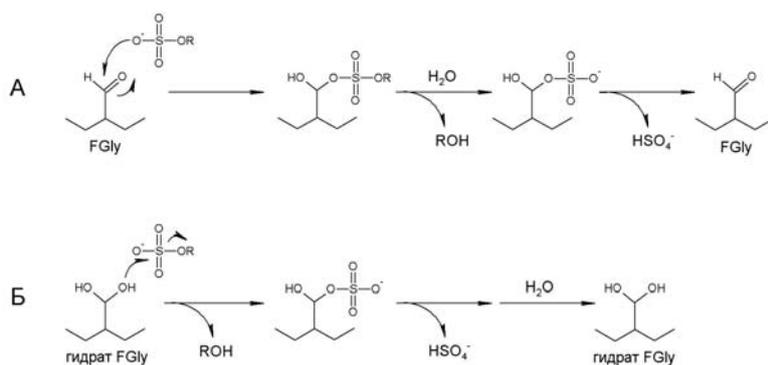


Рис. 1. Предложенные механизмы реакции гидролиза сульфатэфиров, катализируемой FGly-сульфатазами: **А.** Активной формой FGly является альдегид; **Б.** Активной формой FGly является гидрат

Однако недавно нами впервые была выделена и охарактеризована рекомбинантная сульфатаза из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1 [7]. Методом масс-спектрометрии было показано, что, несмотря на наличие гидролитической активности в отношении синтетического субстрата *para*-нитрофенил сульфата, данный фермент содержит в активном центре цистеин вместо FGly. Известно, что рекомбинантная сульфатаза из *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* также не подвергается пост-трансляционной модификации, но способна при этом катализировать реакцию гидролиза сульфатэфиров [8]. Учитывая эти данные, можно сделать вывод, что механизм катализа реакции гидролиза сульфатэфиров до сих пор не ясен. Таким образом, целью настоящей работы было исследование активного центра *F.p.Sulf* и определение ключевых аминокислотных остатков, которые участвуют в процессе гидролиза.

Для определения ключевых аминокислотных остатков, участвующих в процессе гидролиза, нами была построена теоретическая пространственная модель рекомбинантной сульфатазы из *F.proliferatum* LE1 (*F.p.Sulf*) (Рисунок 2), основанная на структуре его близкого гомолога - сульфатазы из *S.melliloti* (SmCS, идентичность последовательности 44%) [PDB код: 4UG4].

Для подтверждения механизма действия, подразумевающего нуклеофильную атаку на атом серы, были предложены аминокислотные замены C77S и C77T, которые благодаря наличию в остатках серина и треонина более сильного нуклеофила потенциально могут привести к увеличению активности исследуемого белка. Также были предложены аминокислотные замены C77A, K327A, H220A, K125A, H127A для определения ключевых остатков в активном центре фермента *F.p.Sulf*, способных участвовать в связывании субстрата и каталитической реакции. По аналогии с описанным механизмом действия для белка SmCS [9] аминокислотные остатки K327 и H220 могут отвечать за протонирование уходящей группы при гидролизе сульфатных эфиров, а K125 и H127 за координацию сульфогруппы перед нуклеофильной атакой.



Рис. 2. Пространственная модель мономера *F.p. Sulf*

Предложенные мутации были внесены методом сайт-направленного мутагенеза, и соответствующие ферменты были выделены и очищены. Было показано, что все аминокислотные замены привели к инактивации сульфатазы. Таким образом, можно сделать вывод, что аминокислоты C77, K327, H220, K125 и H127 действительно участвуют в процессе реакции гидролиза сульфозэфиров.

Полученные результаты послужат основой для дальнейших структурно-функциональных исследований рекомбинантной сульфатазы из мицелиального гриба *F.proliferatum* LE1.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-34-00143)

Литература

1. Hanson, S.R., Best, M.D. and Wong, C.H. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 5736–5763.
2. Diez-Roux, G. and Ballabio, A. (2005) *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **6**, 355–379.
3. Parenti, G., Meroni, G. and Ballabio, A. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 386–391.
4. Markham, P., Robson, G.D., Bainbridge, B.W. and Trinci, A.P. (1993) *FEMS microbiology reviews*, **10**, 287–300.
5. Barbeyron, T., Brillet-Guéguen, L., Carré, W., Carrière, C., Caron, C., Czjzek, M., Hoebeke, M. and Michel, G. (2016) *PLoS One*, **11**, e0164846.
6. Williams, S.J., Denehy, E. and Krenske, E.H. (2014) *The Journal of Organic Chemistry*, **79**, 1995–2005.
7. Korban, S.A., Bobrov, K.S., Maynskova, M.A., Naryzhny, S.N., Vlasova, O.L., Eneyskaya, E.V. and Kulminskaya, A.A. (2017) *Protein Eng. Des. Sel.*, **30**, 571.
8. Sánchez-Romero, J.J. and Olguin, L.F. (2015) *Biochemistry and Biophysics Reports*, **3**, 161–168.
9. Loo, B. van, Schober, M., Valkov, E., Heberlein, M., Bornberg-Bauer, E., Faber, K., Hyvönen, M. and Hollfelder, F. (2018) *J Mol Biol*, **430**, 1004–1023.

Биохимический анализ при оценке эффективности рекультивации нарушенных тундровых почв

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

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино
 rauf-galiulin@rambler.ru

² ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пущино

Рекультивацию нарушенных тундровых почв, т.е. восстановление их плодородия, осуществляли на Тазовском полуострове Ямало-Ненецкого автономного округа (67°15' с. ш., 74°40' в. д.) в районе функционирования ООО «Газпром добыча Ямбург», рисунок.



Карта-схема исследуемой территории: 1 – полуостров Ямал; 2 – Тазовский полуостров (68°09' с.ш., 76°02' в.д.); 3 – Гыданский полуостров; 4 – междуречье рек Пур и Таз; а – реки; б – озера; в – болота; г – район рекультивации нарушенных тундровых почв

Нарушения тундровых почв в данном районе происходили при проезде техники, связанного с осуществлением геологоразведки, бурения скважин и обустройства промыслов по добыче газа и газового конденсата. В результате почвы частично или полностью лишались растительности и органогенного слоя, а минеральные нижележащие горизонты выходили на дневную поверхность. Для кардинального решения проблемы нарушенных тундровых почв, нами по результатам многолетних исследований была разработана инновационная технология рекультивации почв, связанная с использованием местного торфа и получаемого из него гумата калия, в качестве стимулятора роста и развития растений, а также посева и выращивания смеси многолетних злаковых трав.

Для подтверждения факта реализации технологии рекультивации нарушенных тундровых почв на Тазовском полуострове был проведен лабораторный сравнительный биохимический анализ в различных образцах, оперативно доставленных с фоновой территории (глеезем криогенно-ожеженный тундровый), из участка, планируемого для дальнейшей рекультивации (нарушенная почва), торфяной залежи (торф), а также из района непосредственной рекультивации (рекультивированная почва).

Суть биохимического анализа состояла в определении одного из ключевых показателей восстановления плодородия почвы - активности фермента дегидрогеназы в динамике (5, 10 и 15 сутки). Это не случайно, так как биохимический анализ отличается высокой чувствительностью и экспрессностью, достаточной точностью и стабильностью показателей по сравнению с существующими методами микробиологического анализа. Что касается самой дегидрогеназы, то этот фермент катализирует реакции дегидрирования (отщепления водорода) органических веществ, в частности, углеводов, спиртов и органических кислот, поступающих с растительными остатками в почву и положительно коррелирует с численностью микроорганизмов, четко отражая их функциональную активность.

Доказательством адекватности использования активности дегидрогеназы при оценке эффективности рекультивации нарушенных тундровых почв послужили результаты корреляционного и регрессионного анализа данных опыта по биохимической активности и водно-физических свойств почв. Так, расчет коэффициента корреляции, указывающего на направление и степень сопряженности в изменчивости признаков, показал наличие сильной существенной корреляционной зависимости между активностью дегидрогеназы и капиллярной влагоемкостью ($r = 0,95$), а также активностью дегидрогеназы и полной

влажностью ($r = 0,95$) образцов. Соответствующие формулы корреляционной зависимости, т.е. уравнения линейной регрессии, позволяющие судить о том, как количественно менялся результативный признак (y) при изменении факториального (x) на единицу измерения, имели следующий вид: $y = 2,74 + 0,28x$; $y = 7,71 + 0,15x$. Как оказалось, чем больше была капиллярная и полная влагоемкость образцов, определяемая в значительной степени органической составляющей ($C_{орг.}$) использованных образцов, тем выше была активность дегидрогеназы. Ведущее значение влажности для активности дегидрогеназы почвы связано с тем, что влага определяет нормальное физиологическое состояние микроорганизмов и растений, как продуцентов ферментов в почве, а также поддерживает в реакционном состоянии ферменты и их субстраты (углеводы, спирты, органические кислоты и др.).

Для количественного определения активности дегидрогеназы использовали 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид ($C_{19}H_{15}N_4Cl$), который в анаэробных условиях реакции акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформаза ($C_{19}H_{16}N_4$): $C_{19}H_{15}N_4Cl + H_2 = C_{19}H_{16}N_4 + HCl$.

Субстратом дегидрирования служила глюкоза, а кратную экстракцию образующегося 2,3,5-трифенилформазана производили с помощью этанола с последующим измерением оптической плотности вытяжек отдельных вариантов опыта на спектрофотометре и расчета количества вещества в мкг 2,3,5-трифенилформазана/(г·сут).

Биохимический анализ показал, что самая низкая активность дегидрогеназы наблюдается у нарушенной почвы, т.е. она была в 5,2–9,1 раза меньше, чем у глеезема криогенно-ожелезненного тундрового, используемого в наших исследованиях как эталон. Внесение торфа в нарушенную почву и использование препарата гумата калия как стимулятора роста и развития растений при выращивании многолетних злаковых трав должны были привести к повышению активности фермента. И действительно, активность дегидрогеназы рекультивированной почвы оказалась больше активности нарушенной почвы в 26,9–57,2 раза. О стимулирующем эффекте торфа свидетельствует тот факт, что его биохимическая активность была выше активности глеезема криогенно-ожелезненного тундрового в 3,0–3,3 раза. Симптоматично, что активность дегидрогеназы положительно коррелировала с содержанием $C_{орг}$ в диапазоне 0,2–49,2%, что является убедительным подтверждением корректности результатов исследований.

Таким образом, данные по биохимическому анализу исследуемых почв подтверждают факт успешной реализации инновационной технологии рекультивации нарушенных тундровых почв на Тазовском полуострове, и позволяют прийти к заключению о дальнейшем ее применении на территориях, где ООО «Газпром добыча Ямбург» проводит геологоразведочные работы, обустройство и разработку новых месторождений, осуществляет добычу газа и газового конденсата и их подготовку к транспорту.

Фотоавтотрофные культуры *Chlamydomonas reinhardtii*: дефицит серы, анаэробиз и образование водорода

Гречаник В.И., Цыганков А.А.

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институтская, vi.semina@gmail.com

Микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* способна к синтезу двух гидрогеназ в анаэробных условиях с последующим светозависимым выделением водорода. Недостаток в среде таких элементов как S, N и P индуцирует ряд специфических изменений

метаболизма в зеленых микроводорослях, способствуя установлению анаэробных условий в биореакторе, индукции гидрогеназы и длительному выделению водорода на свету. Данных в отношении адаптации фотоавтотрофных культур к недостатку серы в аэробных и анаэробных условиях немного.

Целью данной работы было сравнение особенностей адаптации фотоавтотрофных культур к недостатку серы в аэробных и анаэробных условиях.

Эксперименты проводили в фотобиореакторе на основе коаксиальных цилиндров с освещением лампами, находящимися на оси цилиндров. Проводили периодическое культивирование с компьютеризированным контролем температуры, pH, концентрации кислорода, оптической плотности. К фотобиореактору был подсоединен ПАМ флуориметр (JUNIOR PAM, WALTZ), позволяющий измерять F_0 и F_v . Подобрана среда, в которой рост культур в аэробных условиях происходил до концентрации хлорофилла 60 мг/л без лимитирования минеральными компонентами.

Показано, что в подобранной среде рост культур при продувке газовой смесью воздух +2% CO₂ реальный квантовый выход фотосинтеза не снижался при увеличении концентрации клеток до 60 мг/л. В то же время при продувке культур смесью аргон+2% CO₂ после достижения концентрации клеток 30 мг/л реальный квантовый выход начинал снижаться вместе с содержанием кислорода в среде. При недостатке серы реальный квантовый выход начинал снижаться как в аэробных, так и в анаэробных условиях практически одинаково.

При культивировании *C. reinhardtii* при продувке газовой смесью воздух +2% CO₂ при недостатке серы оптическая плотность (D_{630}) увеличивалась до 20 часов культивирования и после 30 часа начинала снижаться. Содержание Chl(a+b) также увеличивалось до 20 ч и после этого начало уменьшаться. Соотношение Chl a/Chl b оставалось неизменным на протяжении всего эксперимента. Содержание крахмала в клетках увеличивалось до 28 ч и после этого уменьшалось. Таким образом, с 20 часа культура начинала испытывать серное голодание. Реальный квантовый выход у PSII начинал снижаться через 10 ч культивирования за счет увеличения F_v и уменьшения F_m .

При культивировании *C. reinhardtii* при продувке газовой смесью аргон+2% CO₂ при недостатке серы оптическая плотность (D_{630}) росла до 45 ч, а затем начинала уменьшаться. Динамика Chl (a+b) была аналогична оптической плотности. Соотношение Chl a/Chl b уменьшалось до 40 ч и увеличивалось после этого. Содержание крахмала в клетках увеличивалось до 28 ч, что указывает на то, что культура пришла к серному голоданию в стадии продуцирования кислорода. Он увеличивался в течение времени увеличения оптической плотности, а затем уменьшался вместе с оптической плотностью. pO_2 был стабильным до 35 ч и после этого снижался (кислородопотребляющая стадия серного голодания), достигая нуля (анаэробная и стадия выделения водорода) при 60 ч. Окислительно-восстановительный потенциал был стабильным, когда pO_2 был стабильным, затем уменьшался одновременно с pO_2 и резко уменьшался, когда pO_2 достигал нуля с последующим увеличением в фазе образования водорода. Водород был обнаружен в газовой фазе при достижении pO_2 5% насыщения. Содержание H₂ в газовой фазе увеличивалось до 85 ч, а затем уменьшалось. H₂ в газовой фазе обнаруживался даже после 130 ч культивирования. Реальный квантовый выход PSII начал снижаться после 40 ч культивирования в основном за счет уменьшения F_m . Обсуждаются сходства и различия адаптации к анаэробно-серному голоданию в разных комбинациях.

Инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы для применения в фаговой терапии

Ким А.Л.^{1,2}, Дубровский А.В.¹, Мусин Е.В.^{1,2}, Арискина Е.В.³, Кудряшова Е.Б.³, Тихоненко С.А.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино

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

³ Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино; kimerzent@gmail.com

В последние годы в биомедицине приобретает развитие фаготерапия - метод лечения бактериальных заболеваний, путем введения бактериофага в организм больного. Данный метод показал эффективную замену антибиотикам, так как, благодаря своей специфичности, бактериофаги убивают патогенные микроорганизмы, при этом не подавляя рост нормофлоры и не оказывая отрицательного влияния на ферментные системы пациента и т.п., но при этом обладают рядом недостатков, а именно: снижение активности бактериофагов под действием желудочного сока и иммунных клеток кишечника, высвобождение большого количества эндотоксинов в результате одновременной гибели грамотрицательных бактерий. Инкапсулирование бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы позволит решить эти проблемы: обеспечить доставку к месту назначения и пролонгированное высвобождение фагов. Целью работы является создание микроконтейнеров для бактериофагов из биodeградируемых полиэлектролитов.

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

В данной работе была продемонстрирована возможность инкапсуляции бактериофагов в полиэлектролитные микрокапсулы, а также показано, что инкапсулированные бактериофаги не оказывают воздействия на целевой бактериальный штамм. После декапсулирования бактериофаги сохраняют свою вирулентность, что подтверждается наличием зон задержек роста целевых микроорганизмов. Подобран оптимальный состав оболочки микрокапсулы, который можно представить как - (ПАр/ДС)₃.

Конструирование рекомбинационных кассет для создания вируса АЧС с делецией гена A224L

Кольцова Г.С., Малоголовкин А.С.

ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии",
п. Вольгинский, Lila5757@yandex.ru

Африканская чума свиней (АЧС) является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний домашних свиней, средства специфической профилактики которой не разработаны. Возбудителем болезни является большой, оболочечный и сложноорганизованный ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae*.

Начиная с 2007 года, во многих субъектах Российской Федерации отмечается неблагополучная эпизоотологическая обстановка по АЧС. С 2014 года вспышки АЧС регистрируются и в других европейских странах (Польша, Эстония, Латвия, Литва, Чехия, Румыния, Болгария), а с 2018 года в Китае. Отсутствие эффективных и безопасных вакцин затрудняет контроль болезни. Искоренение АЧС осложняется и циркуляция вируса в популяции кабанов, а на Африканском континенте в популяциях диких африканских свиней (*Phacochoerus africanus*, *P. aethiopicus*, *Potamochoerus porcus*, *Potamochoerus larvatus*, *Hylochoerus meinertzhageni*) и мягких клещей рода *Ornithodoros*, которые являются резервуаром инфекции.

Несмотря на почти многолетнюю историю изучения вируса АЧС, многие фундаментальные вопросы биологии возбудителя остаются до конца не изученными. Вирус АЧС обладает исключительным потенциалом для уклонения от иммунной системы

организма. Один из наиболее важных способов в иммунном уклонении основан на предотвращении внутриклеточного апоптоза. Апоптоз представляет собой важный механизм врожденного иммунного ответа для предотвращения вирусной инфекции. Однако многие вирусы разработали стратегии ингибирования или задержки этого клеточного ответа. Геном вируса АЧС содержит ряд генов, продукты которых активно участвуют в процессе ингибирования апоптоза. Одним из них является белок А224L вируса АЧС, который является аналогом ингибитора апоптоза (IAP). Вирусный белок А224L взаимодействует с протеолитическим фрагментом каспазы-3 и ингибирует активность протеазы при вирусной инфекции. Кроме того, было отмечено, что А224L активирует NF-κB. Активация NF-κB, опосредованной TNF-R2, может ингибировать апоптозную гибель клеток путем активации транскрипции ряда антиапоптотических генов, включая членов семейства *IAP* и *Bcl-2*.

Сравнение гена А224L различных штаммов вируса АЧС продемонстрировало достаточно высокую степень гомологии нуклеотидных (92-100 %) и аминокислотных (91-100 %) последовательностей. Кроме того, нами было показано, что многократное пассирование вируса (более 200 пассажей) на гомологичной культуре клеток не приводит к возникновению мутаций в данном гене.

Целью данной работы являлось создание генетических конструкций для получения рекомбинантных штаммов вируса АЧС 2 сероиммунотипа с делециями гена А224L.

В работе использовали вирулентный штамм К49 (I генотип, 2 сероиммунотип) и аттенуированный штамм КК-262 (I генотип, 2 сероиммунотип). Как было отмечено ранее, последовательности гена А224L штаммов не отличались, однако области генома, расположенные слева и справа данного гена, содержат как единичные нуклеотидные замены, так и делеции/вставки. Таким образом, для получения двух рекомбинантных вирусов АЧС 2 сероиммунотипа необходимо было получить 2 различные рекомбинационные кассеты.

Олигонуклеотидные праймеры со специфическими последовательностями сайтов рестрикции эндонуклеаз были подобраны для амплификации «плечей» рекомбинации и гена EGFP (флюоресцентный маркер) с целью дальнейшего их клонирования в плазмидный вектор pGEM-T. Плечи рекомбинации представляли собой фрагменты генома вируса АЧС длиной 700-900 п.о., расположенные слева и справа от гена А224L. Ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок EGFP, под контролем промоутера гена В646L вируса АЧС был использован в качестве репортерного гена во всех двух конструкциях для дальнейшего скрининга рекомбинантных клонов.

В результате последовательного клонирования получены две рекомбинантные плазмиды на основе вектора pGEM®-TEasy vector. Гены MGF505 10R, А240L, А104L вируса АЧС и ген EGFP входят в состав каждой плазмиды для делеции гена А224L. Отсутствие нуклеотидных замен в рекомбинантных плаزمидах подтверждено нуклеотидным секвенированием. Одна из полученных плазмид (для делеции гена А224L штамма КК-262) содержала мутацию в межгенном регионе А224L/А104L. В связи с тем, что межгенные регионы вируса АЧС могут содержать промоутеры или других регуляторные области было принято решение исправить данную нуклеотидную замену путем сайт-специфического мутагенеза.

Полученные генетические конструкции на основе плазмидных векторов будут в дальнейшем использованы для гомологичной рекомбинации с целью получения рекомбинантных вирусов АЧС с удаленными генами А224L.

Создание рекомбинантных вирусов, полученных путем замены или удаления различных генов, будет способствовать лучшему пониманию жизненного цикла вируса и функций отдельных белков вируса АЧС *in vitro* и *in vivo*. Важной особенностью данной работы является использования вирулентного и аттенуированного штаммов вируса, что позволит получить реципрокные результаты по оценке функции белка ингибитора апоптоза при острой и инапарантной инфекции.

Влияние композитного сорбента и биопрепарата «Деворойл» на скорость детоксикации серой лесной почвы, загрязнённой нефтью

Кондрашина В.С., Стрижакова Е.Р., Васильева Г.К.

ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
г. Пущино, vsyatsenko@yandex.ru

В последние десятилетия одной из главных экологических проблем во всем мире стало загрязнение почв углеводородами нефти (УВН). Проблема загрязнения почв УВН стоит весьма остро, поскольку пропитывая почву, нефть изменяет её свойства, ухудшает доступ кислорода и влаги растениям. В связи с постоянно растущим уровнем загрязнения почв углеводородами, одним из важнейших направлений является разработка эффективных и экономичных методов очистки загрязнённых почв. При загрязнении почвы УВН первоочередной задачей является снятие первичной токсичности, которая сильно замедляет процессы очищения и восстановления почв. Ранее нами было показано, что внесение сорбентов, в частности активированного угля, может существенно ускорить процесс очищения почв загрязнённых разнообразными органическими химикатами.

Целью данной работы было изучить влияние композитного сорбента (АУД) на основе гранулированного активированного угля (ГАУ) и диатомита на скорость детоксикации серой лесной почвы, загрязнённой нефтью в дозе 50, 100 и 150 г/кг после выветривания лёгкой фракции углеводородов: варианты 5Н, 10Н и 15Н соответственно. Исследования проводили в условиях вегетационного эксперимента. В самом начале обработки в почву вносили сорбент (предварительно установленные оптимальные дозы 3, 6 и 9%, соответственно) и биопрепарат «Деворойл» (БП) на основе штаммов нефтедеструкторов, как индивидуально, так и в комплексе. В почву вносили также доломитовую муку (0,3 г/кг) для предотвращения избыточного подкисления почвы и минеральные удобрения, дробно, исходя из суммарного соотношения С:N:P:K=50:1:0,5:0,5. В ходе эксперимента определяли суммарное содержание УВН и их окисленных форм (ОУВН) методом ИК-спектрии (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98). Динамику численности микроорганизмов-нефтедеструкторов (НД) определяли методом высева на селективную агаризованную среду, где единственным источником углерода и энергии служили пары дизельного топлива. Интегральную биотоксичность почв оценивали с помощью экспресс-метода по всхожести семян клевера белого (*Trifolium repens*). В качестве дополнительного метода фитотестирования использовали аллиум тест, в котором токсичность почвенной вытяжки оценивалась по длине корней лука-севка (*Allium cepa*). Кроме того, в конце каждого сезона оценивали фитотоксичность почв с помощью сертифицированного метода, основанного на определении показателей роста пшеницы (*Triticum durum L.*) (ФР.1.39.2006.02264). Агрохимические (рН, содержание NPK), а также физические (влажность и пористость) свойства почв определяли с помощью стандартных методов. Для изучения влияния сорбентов на степень подвижности токсикантов определяли содержание УВН и ОУВН в промывных водах.

Установлено, что при поверхностном загрязнении почвы за несколько суток улетучилось 20-25% углеводородов лёгкой фракции. При этом исходный уровень суммарного содержания загрязнителей (СУВН=УВН+ОУВН) в почвах 5Н, 10Н и 15Н составил 39; 81 и 112 г/кг, а УВН - 28; 67 и 92 г/кг, соответственно. За 5 месяцев обработки путем активации аборигенной микрофлоры без добавок сорбента и биопрепарата (Контроль) концентрация УВН снизилась до 11; 27 и 37 г/кг, соответственно, т.е. на 59-61%. Дополнительное внесение биопрепарата обеспечило более

полное разложение нефти (на 61-67%) только в двух почвах с повышенной дозой нефти. Однако наибольший эффект дало внесение АУД совместно с БП, где степень разложения УВН достигла 64-72%. Максимальная разница между вариантами наблюдалась в наиболее загрязнённой почве, где остаточная концентрация УВН снизилась до 27 по сравнению с 38 г/кг в контроле без добавок.

По мере разложения нефти в почве накапливались значительные количества ОУВН, содержание которых достигало максимума к середине или к концу 1-го сезона очистки, затем постепенно снижалось, но оставалось высоким до конца 2-го сезона, особенно в сильно загрязнённых почвах.

Установлено, что внесение оптимальных доз АУД обеспечило более быстрое снижение токсичности всех загрязнённых почв, что оказало положительное влияние на все показатели почв, особенно в наиболее загрязнённых вариантах. В чистой серой лесной почве численность аборигенных НД в течение всего эксперимента колебалась в пределах 0,2-4 млн. КОЕ/г. Однако после загрязнения нефтью она резко возросла. Не смотря на присутствие более высоких концентраций субстрата в виде углеводов нефти в вариантах 5Н<10Н<15Н, максимальная численность НД в контрольных почвах (К) изменялась в обратном порядке: 830>600>380 млн. КОЕ/г соответственно. В аналогичных загрязнённых почвах, обработанных «Деворойлом», расчётная исходная численность НД составила 32 млн. КОЕ/г, что на 1-2 порядка превышает численность аборигенных НД, однако в последующие месяцы более высокая численность НД по сравнению с инокулированным контролем наблюдалась лишь в тех образцах, когда БП вносился одновременно с сорбентом. В остальных образцах рост численности как аборигенных, так и инокулированных нефтедеструкторов сильно ингибировался, особенно в вариантах с повышенным уровнем загрязнения.

Биотестирование с помощью сертифицированного метода (по длине корней пшеницы) показало снижение фитотоксичности почв к концу 2-го сезона лишь в наименее загрязнённой почве, тогда как в высоко загрязнённых почвах растения были ещё сильно угнетены. Одновременное проведение алиум-теста в конце 2-го сезона подтвердило наличие токсичных веществ в почвенных вытяжках вариантов К и БП (фитотоксичность 20-60%), тогда как в вариантах с АУД фитотоксичность почвенных вытяжек не превышала 8-26%. Это свидетельствует о том, что снижение фитотоксичности почв в присутствии АУД происходит за счёт обратимой сорбции углеводов и метаболитов. При этом сорбированные ксенобиотики остаются в основном доступными для дальнейшего микробного разложения, о чём свидетельствует ускоренное разложение УВН в сильно загрязнённых почвах.

Показано также, что внесение сорбентов резко повышает влагоёмкость и пористость загрязнённых почв, что является дополнительным фактором положительного действия сорбентов. Кроме того изучение промывных вод показало, что вымываются преимущественно ОУВН, особенно в процессе биоремедиации сильно загрязнённых почв. Особенно высокие концентрации ОУВН (2, 17, 20 мг/л, соответственно) обнаруживаются в промывных водах контрольных почв (К), что коррелирует с их повышенной фитотоксичностью (5, 73 и 95% соответственно), тогда как в вариантах с сорбентом содержание окисленных углеводов в несколько раз ниже (1, 5, 7 мг/л, соответственно), а фитотоксичность их - минимальная.

Таким образом, внесение оптимальных доз композитного сорбента на основе гранулированного активированного угля и диатомита существенно ускоряет процесс детоксикации и биоремедиации серой лесной почвы, сильно загрязненной выветренной нефтью с исходной концентрацией от 80 до 110 г/кг. Механизм действия сорбента основан на снижении токсичности почв для растений и микроорганизмов нефтедеструкторов за счёт обратимой сорбции углеводов и их метаболитов, а также за счёт улучшения водно-воздушного режима почв и снижения гидрофобности. Помимо этого внесение

сорбента обеспечивает локализацию загрязнителей в обрабатываемом слое, что позволяет проводить биоремедиацию сильнозагрязнённых почв в условиях *in situ*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-05-00617а

Образование биопленок патогенных микроорганизмов в присутствии гидрозоля железа(III)

Леонова Л.В.¹, Черепанов Д.В., Леонов В.В.^{1,2}, Соловьев В.Г.¹

¹БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», Ханты-Мансийск,
leonovalv@yandex.ru

²ФГБУ ВО «Югорский государственный университет», Ханты-Мансийск

В Ханты-Мансийском автономном округе – Югре, в качестве основного источника питьевого водоснабжения используются подземные воды. Одной из основных проблем использования подземных вод, является высокое содержание железа и марганца, что приводит к избыточному размножению железо- и марганцеоксилирующих бактерий [1]. В результате окисления и/или восстановления соединений железа в системах водоснабжения происходит стимулирование биокоррозии трубопровода и формирование биообрастаний, приводящих к вторичному загрязнению воды и понижению ее санитарно-химических показателей [2].

Неоднократно высказывалось предположение о возможности выживания в составе биообрастаний железобактерий патогенных микроорганизмов, однако экспериментальных доказательств этому нами в литературе не обнаружено. В состав биообрастаний, входит множество органических соединений, которые потенциально могут служить питательным субстратом для патогенных микроорганизмов и если не стимулировать их рост, то способствовать выживанию, а образующийся в процессе окисления коллоидный осадок $Fe(OH)_3 \cdot nH_2O$ формирует защитную оболочку и делает биообрастание устойчивым к проникновению дезинфицирующих средств [3].

Цель работы: изучить возможность образование биопленок патогенными микроорганизмами в условиях, моделирующих жизнедеятельность железобактерий.

В качестве объекта исследования использовали актуальные в инфекционной патологии человека возбудители *Y. enterocolitica* 610, *P. aeruginosa* 24853, *S. enteritidis* 827, *S. aureus* 2888. Все штаммы были выделены от больных Окружной клинической больницы. Биопленки выращивали на полипропиленовых подложках размером 1×1 см. В качестве питательной среды использовался LB-бульон следующего состава (в г/л): триптон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 5,0, pH 7,0. Моделирование жизнедеятельности железобактерий осуществляли добавлением гидрозоля железа(III) в концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, пересчитанного на ион Fe^{3+} . Контрольные опыты ставили аналогично, но без добавления гидрозоля железа. Все посева, культивировали при 25°C, в течение двух месяцев, при постоянном перемешивании. Количественное содержание бактерий в биопленках определяли методом серийных разведений и выражали в КОЕ/см².

Деятельность железобактерий может приводить к коагуляции гидрозоля железа(III) и образованию частиц нерастворимого $Fe(OH)_3 \cdot nH_2O$, которые могут служить субстратом для адгезии бактериальных клеток и способствовать формированию биопленок. Все микроорганизмы в процессе культивирования приводили к коагуляции гидрозоля железа и образованию хлопьев бурого гидроксида железа, в случае с *S. enteritidis* происходило почернение биопленки в результате образования сульфида железа.

Результаты количественного определения содержания микроорганизмов в биопленке приведены в таблице. Как видно из представленных данных, все микроорганизмы способны выживать и образовывать биопленки в присутствии $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Для исследуемых микроорганизмов выявлено ингибирование биопленкообразования в присутствии $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ по сравнению с контролем. Ингибирование биопленкообразования *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* и *Y. enterocolitica* происходило в 1,1, а *S. aureus* в 2,9 раз по сравнению с контролем.

Табл. Образование биопленки в присутствии $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$

Микроорганизмы	IgКОЕ опыт	IgКОЕ контроль
<i>S. enteritidis</i> 827	7,23	8,33
<i>P. aeruginosa</i> 24853	6,95	8,12
<i>Y. enterocolitica</i> 610	6,51	7,24
<i>S. aureus</i> 2888	1,54	4,52

По результатам проведенного исследования можно выстроить, изученные штаммы микроорганизмов в ряд по способности выживать в составе биопленок в присутствии $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$: *S. aureus* < *Y. enterocolitica* < *P. aeruginosa* < *S. enteritidis*.

Таким образом, данные проведенного модельного эксперимента позволяют подтвердить возможность выживания патогенных микроорганизмов в составе биопленок железобактерий.

Литература

1. Ebacher G., Besner M.C., Clément B., Prévost M. Sensitivity analysis of some critical factors affecting simulated intrusion volumes during a low pressure transient event in a full-scale water distribution system // Water Res. 2012. V. 46(13). P. 4017-4030.
2. Chen L., Jia R.B., Li L. Bacterial community of iron tubercles from a drinking water distribution system and its occurrence in stagnant tap water. // Environ Sci Process Impacts. 2013. V.15. P.1332-40.
3. Maruf M., Moniruzzaman K., Martin T. Review of Iron Bacteria in Water Distribution and their Identification in a Simulated Cast Iron Water Distribution System. // UAP Journal of Civil and Environmental Engineering. 2006. V. 2(1). P. 13-19.

Влияние персистенции *Yersinia pseudotuberculosis* на состояние перекисного окисления липидов и глутатион-зависимой системы в эритроцитах крови детей

Носарева О.Л., Степовая Е.А., Помогаева А.П., Шахристова Е.В.

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, olnosareva@yandex.ru

Актуальность

Среди острых кишечных инфекций псевдотуберкулез занимает второе место после шигеллезов и имеет высокую степень заболеваемости у детей. Псевдотуберкулез относится к инфекциям, протекающим с гематогенной и лимфогенной диссеминацией возбудителя. Персистенция *Yersinia pseudotuberculosis* сопровождается резко выраженным токсико-аллергическим синдромом. В результате происходит накопление активных

кислородных метаболитов как за счет активации системы фагоцитоза, элиминирующей инфекционного возбудителя, так и действия на клетки макроорганизма эндо-, экзотоксинов и факторов, способствующих адгезии и инвазии *Yersinia pseudotuberculosis*. Происходящая дестабилизация бислоя мембранных липидов под воздействием псевдотуберкулезного микроба и его токсинов способствует активации перекисного окисления липидов и накоплению токсических продуктов свободно-радикального окисления, для обезвреживания которых необходима достаточная емкость антиоксидантной системы организма. Актуальность исследования обусловлена выяснением особенностей реагирования систем организма на внедрение *Yersinia pseudotuberculosis*, что позволит расширить фундаментальные представления о патогенезе инфекционного процесса у детей.

Цель работы – оценить уровень метаболитов перекисного окисления липидов в плазме крови и состояние глутатион-зависимой системы в эритроцитах крови у детей в острый период и период реконвалесценции при гладком течении легкой и средней степени тяжести псевдотуберкулеза.

Материал и методы

Проведено проспективное исследование 81 больного, из них 17 пациентов с легкой степенью и 64 – со средней степенью тяжести псевдотуберкулеза, госпитализированных в детскую инфекционную больницу им. заслуженного врача РФ Г.Е. Сибирцева г. Томска. Средний возраст пациентов, имеющих легкую степень заболевания, составил $9,96 \pm 0,56$ лет, среднюю степень – $10,39 \pm 0,43$ лет. Группа сравнения (контроль) была представлена 45 детьми ($9,98 \pm 0,44$ лет) с группой здоровья IIА.

Диагноз псевдотуберкулеза устанавливался по клинико-эпидемиологическим данным, подтвержден бактериологически у 12,1% больных. У 87,9% больных определялись специфические антитела в динамике болезни с нарастанием титра от 1:100 до 1:3200. При постановке клинического диагноза использовали классификацию с учетом клинико-патогенетического принципа А.А. Колтыпина (2001), согласно которому выделяются тип, тяжесть, течение псевдотуберкулеза. Все наблюдавшиеся больные имели типичную форму псевдотуберкулеза. Гладкое течение болезни имел 81 (100%) ребенок.

Материал исследования: компоненты венозной крови, взятой утром натощак из локтевой вены: эритроциты и плазма. В плазме крови проводили определение содержания диеновых конъюгатов с максимумом поглощения при длине волны 233 нм и ТБК-активных продуктов с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. В эритроцитах определяли содержание восстановленной формы глутатиона по реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) и активность ферментов: глутатионпероксидазы – по катализу реакции взаимодействия восстановленного глутатиона с гидроперекисью Т-бутила; глутатионредуктазы – по НАДФН-зависимому преобразованию окисленной формы глутатиона в восстановленную. Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием программы Statistica 6,0. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Уилки. Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 - Q_3). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Липополисахарид и другие токсины *Yersinia pseudotuberculosis* вызывают активацию полиморфноядерных нейтрофилов, следствием которой является «дыхательный взрыв» с продукцией активных форм кислорода, чему способствуют также нарушение микроциркуляции, возникновение гипоксии тканей. Все это потенцирует повышенное образование реактивных оксидантов в различных клетках и в целом содействует проявлению их прооксидантных эффектов в организме, в том числе активации процессов перекисного окисления липидов.

В проведенном нами исследовании показана четкая связь увеличения концентрации диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов в плазме крови со снижением содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах детей больных псевдотуберкулезом в острый период заболевания с утяжелением патологического процесса. Так, в острый период заболевания при легкой и средней степени увеличение диеновых конъюгатов составило в 3,64 раза ($p < 0,05$), ТБК-активных продуктов – 4,48 раза ($p < 0,05$) соответственно; снижение восстановленного глутатиона – в 1,40 раза ($p < 0,05$) и 2,05 раза ($p < 0,05$), соответственно по сравнению с результатами, полученными в группе контроля. В фазу выздоровления у всех больных детей происходила нормализация уровня диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов, а также повышение уровня восстановленного глутатиона, но значения концентрации тиола оставались достоверно ниже показателей здоровых детей.

Снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах у детей в острый период с легкой и средней степенью псевдотуберкулеза было обеспечено увеличением активности глутатионпероксидазы, использующей этот тиол в качестве одного из субстратов при обезвреживании пероксидов. Так, в острый период заболевания при легкой и средней степени увеличение активности глутатионпероксидазы составило в 1,64 раза ($p < 0,05$) и в 1,55 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с показателями, полученными в группе контроля. В фазу выздоровления у всех больных детей активность фермента не имела достоверно значимого различия по сравнению с результатом у здоровых детей. Также следует отметить, что у детей, как в острый период, так и в период выздоровления с легкой и средней степенью псевдотуберкулеза повышенная активность глутатионредуктазы не приводила к адекватной регенерации пула восстановленного глутатиона. Данный факт можно рассматривать как адаптационную реакцию, направленную на поддержание необходимого уровня восстановленного глутатиона, усиленно расходуемого при окислительном стрессе в условиях инфекционного воспаления.

Таким образом, в проведенном нами исследовании было показано, что с увеличением степени инфекционного патологического процесса, а соответственно и уровня окислительного стресса, наблюдалась большая степень снижения концентрации восстановленного глутатиона и увеличение активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах больных детей.

Особенности выделения водорода у мутантов *Anabaena* PCC 7120 с модифицированной нитрогеназой в отсутствие Нур гидрогеназы

Романова А.И., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А.

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино, gavrisheva.ast@gmail.com

Для устойчивого развития человечество нуждается в энергии. Традиционное использование ископаемых источников энергии приводит к нарастающим проблемам загрязнения окружающей среды, повышению содержания углекислоты в атмосфере и повышению средней температуры поверхности Земли. Этим обусловлена ориентация на использование альтернативных источников энергии, и в частности солнечной энергии. Одним из способов запасаения солнечной энергии может быть образование водорода биологическим путем. Водород – экологически чистый энергоноситель, поскольку продуктом его окисления является вода.

Фотобиологическое выделение водорода цианобактериями считается многими исследователями идеальным процессом получения возобновляемой энергии, потому что вода в качестве электронного донора и свет как источник энергии легко доступны и находятся в изобилии. Группа гетероцистных цианобактерий является наиболее исследованной как с точки зрения физиологии, так и молекулярной биологии. Выделение водорода у них катализируется нитрогеназой и/или Н₂ гидрогеназой, причем оба фермента чувствительны к кислороду. Однако нитрогеназа, в отличие от гидрогеназы, катализирует необратимый процесс, что считается более перспективным.

Для создания анаэробных условий при выделении водорода обычно используется проток аргона в качестве газовой фазы, что существенно удорожает процесс. Оптимальным было бы проведение процесса под азотом или воздухом, однако в этом случае нитрогеназная активность максимальна лишь в течение короткого времени: аммоний, образуемый в процессе фиксации молекулярного азота, подавляет синтез нитрогеназы. Именно поэтому Masukawa et al. были сконструированы и охарактеризованы мутанты штамма *Anabaena* PCC 7120 без Н₂-гидрогеназы с аминокислотными заменами dc-Q193S и dc-R284H, расположенными в непосредственной близости от FeMo-кофактора нитрогеназы.

Такие мутанты представляют несомненный интерес в биотехнологическом получении водорода, однако необходимо дополнительное изучение их свойств, в частности, определение максимальных скоростей и констант насыщения светом для нитрогеназной активности. Сравнение констант ингибирования ацетиленом у разных мутантов может быть полезным для выяснения влияния аминокислотных замен на функционирование активного центра нитрогеназы.

Целью работы было сравнить фотосинтетическую активность и способность к выделению водорода у цианобактерий *Anabaena sp.* PCC 7120: родительского штамма ΔН₂, мутантов dc-Q193S и dc-R284H в зависимости от интенсивности света, температуры, наличия молекулярного азота и ацетилена в разных концентрациях.

Мутанты dc-Q193S и dc-R284H не отличались от родительского штамма ΔН₂ по скоростям роста при использовании связанного азота, но не могли расти с использованием молекулярного азота и имели пониженную фотосинтетическую активность. Нитрогеназную активность определяли по скорости выделения водорода с использованием двух методов: электрохимического с водородным электродом и газохроматографического. Нитрогеназная активность родительского штамма достигала 25 мкмоль Н₂/(мг Хл а ч), а у мутантов - около 18 мкмоль Н₂/(мг Хл а ч). Мутанты как и родительский штамм не синтезировали водород-поглощающую Н₂ гидрогеназу, что позволяло избежать поглощения выделившегося водорода, особенно в присутствии кислорода. Выделение водорода у мутантов мало отличалось от родительского штамма по энергии активации, однако мутант dc-Q193S, в отличие от родительского штамма ΔН₂, продемонстрировал более низкий температурный оптимум для выделения Н₂, что обусловлено, видимо, пониженной прочностью филаментов. Не обнаружено существенных различий по константам насыщения светом (41 - 62 мкмоль квантов/(м² с)) и константам ингибирования ацетиленом (~0,4-1,1 мкМ). Проверено влияние молекулярного азота в широком диапазоне концентраций (28,5-570 мкМ). У родительского штамма наблюдали ингибирование, но даже при 100% N₂ сохранялось до 40% активности. Вычисленная K_i составляла 300 мкМ N₂ (концентрация растворенного азота в жидкости). В отличие от родительского штамма выделение водорода у мутантов не ингибировалось даже при 100% N₂ в газовой фазе. Это особенно перспективно с практической точки зрения, т.к. позволяет использовать в технологическом процессе более дешевую газовую фазу вместо аргона. Однако следует иметь в виду, что неспособность мутантов использовать N₂ имеет и другой аспект – культуры в присутствии воздуха будут находиться в состоянии азотного голодания, что не позволит им сохранять активность длительное время. Обсуждается перспективность направленного мутагенеза

цианобактериальных нитрогеназ для повышения скорости выделения водорода и предлагаются критерии для выбора таких мутантов.

Влияние синтетических поверхностно-активных веществ на бактерии рода *Azotobacter*

Симакова В.С.

ФГБОУ ВО Вятская государственная сельскохозяйственная академия,
г. Киров, vasilina.simakova.1989@mail.ru

Синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ) – широко распространенная группа загрязнителей окружающей среды. К числу таких соединений, в частности, относится анионное (АПАВ) лаурилсульфат натрия (ЛСН) и неионогенное (НПАВ) – автошампунь марки Uni, которые активно используются при мойке автотранспорта. Для определения степени токсичности СПАВ использовали индикаторный организм – аэробные азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* [4].

Ранее было установлено, что внесение автошампуня марки Uni в почву в возрастающих концентрациях (контроль – 4,0 р. д.) привело к изменению численности азотфиксаторов до 10 раз [6].

При этом в структуре микробных комплексов развитие бактерий р. *Azotobacter* при внесении возрастающих доз СПАВ носят нестабильный характер. Для определения силы угнетающего воздействия Uni на бактерии р. *Azotobacter* были приняты индексы, аналогичные широко известному показателю ЛД₂₅ и ЛД₅₀, в которых действующей считается концентрация загрязнителя, на 25% и 50% снижающая определенную численность микробной популяции. Было получено, что происходит усиление угнетающего эффекта исследуемого СПАВ по мере увеличения его концентрации на бактерии р. *Azotobacter* [2].

Так, при ЛД₂₅ для этих групп микроорганизмов угнетающий эффект проявляется при 0,5 р. д., а при ЛД₅₀ – уже при 1 р. д., т. е. в концентрации, рекомендуемой для практического применения при мойке автомобилей.

Затем было изучено влияние СПАВ ЛСН и автошампуня марки Uni на рост и развитие бактерий р. *Azotobacter* в почвах пойменного и суходольного лугов с максимальным содержанием азотобактера [5].

Было установлено, что данные СПАВ оказывают негативное влияние на динамику роста и развития бактерий р. *Azotobacter*: ЛСН снижает обилие (обрастание комочков почвы) азотобактером. При этом максимальный процент обрастания наблюдался в контрольных вариантах.

При максимальной концентрации ЛСН (4 р. д.) в почве пойменного луга обрастание азотобактером сократилось почти в 5,3 раз. В почве суходольного луга при 4,0 р. д. ЛСН происходит снижение процента обрастания комочков почвы азотобактером в 10 раз.

Параллельно с учетом степени обрастания почвенных агрегатов азотобактером определяли средний диаметр их колоний. Однако данный показатель не был результативным и достоверных различий по вариантам не обнаружено [3].

Расчет индексов токсичности, вычисленный для азотобактера показал, что на участке пойменного луга при возрастающих концентрациях ЛСН класс токсичности оценивается на уровне средний класс токсичности – норма.

На участке суходольного луга в интервале 0,25–1,0 р. д. и 4,0 р. д. преобладала низкая токсичность. При 2,0 р. д. наблюдался средний уровень токсичности. Показатель индекса токсичности в промежутке 0,25 – 2,0 р. д. снижался, а к 4,0 р. д. – увеличивался [1].

Таким образом, впервые проведенное исследование токсичности СПАВ автошампуня марки Uni и ЛСН показало возможность использовать такого показателя, как снижение процента обрастания комочков почвы бактериями р. *Azotobacter* и возрастание индекса токсичности для азотобактера по мере увеличения концентрации СПАВ.

Автор выражает признательность д.б.н., профессору Л.И. Домрачевой за помощь в подготовке тезисов.

Литература

1. Багдасарян А.С. Биотестирование почв техногенных зон городских территорий с использованием растительных организмов: дис. канд. биол. наук. Ставрополь, 2005. 160 с.
2. Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ. 1989. 206 с.
3. Мынбаева Б.Н., Курманбаев А.А., Воронова Н.В. Микробная биоиндикация почв г. Алма-Аты с помощью культуры *Azotobacter* // Фундаментальные исследования. 2011. № 6. С. 206-209.
4. Остроумов С.А. Биологические эффекты поверхностно-активных веществ в связи с антропогенными воздействиями на организмы: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2000 г. 17 с.
5. Симакова В. С. Влияние возрастающих концентраций анионного синтетического поверхностно-активного вещества лаурилсульфата натрия на динамику роста и развития бактерий рода *Azotobacter* в почвах после завершения работ на объекте по хранению и уничтожению оружия «Марадыковский» // World science: problems and innovations: Матер. XX Междунар. науч.-практ. конф. – Ч. 2. – Пенза, 2018. С. 24-27.
6. Симакова В. С., Берг А. А. Влияние автошампуня Uni на рост и развитие бактерий-азотфиксаторов // Знания молодых - будущее России: Матер. XVI Междунар. студ. науч. конф. – Ч. 1. – Киров, 2018. С. 6-9.

Доля фагов Т4-типа среди колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни

¹Скобликов Н.Э., ¹Осенчук Д.В., ¹Москаленко Е.А., ²Зимин А.А.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства
г. Краснодар, skoblikow@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
г. Пушкино

Колифаги (бактериофаги *E.coli*) выделенные из нормофлоры 15 цыплят в возрасте от 4 до 38 дней, исследованы на наличие генетических маркеров, характерных для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae*. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 6-кратно с интервалом 6-8 дней. Всего было отобрано и исследовано 90 проб, из которых фаги выделялись в доступном для детекции титре на культуре *E. coli* BL 21 лишь в 36 пробах. Всего было отобрано 60 фагов, характеризующихся морфологическим разнообразием бляшек.

Молекулярно-генетическую характеристику бактериофагов осуществляли с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специальными праймерами, позволяющими выявить наличие характеристических для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae* генетических маркеров. К таким маркерам относятся ген 23, кодирующий

основной белок головки фага (праймеры *MZia1* и *Cap8*) и ген 32 (праймеры *FR60* и *FR61*) (табл.1).

Табл. 1

Праймеры, использовавшиеся для молекулярно-генетической характеристики бактериофагов

	Праймер	Последовательность	Длина	T _m , °C
	<i>MZia1</i>	5'-TGTTATIGGTATGGTICGICGTGCTAT-3'	27	60,5
	<i>Cap8</i>	5'-TGAAGTTACCTTCACCACGACCGG-3'	24	62,8
	<i>FR60</i>	5'-CGTAAATCTACTGCTGAACCTCGC-3'	23	54,9
	<i>FR61</i>	5'-GAATGCATCCAAATCATCAGCCAC-3'	24	58,9

Для проведения ПЦР готовили смесь следующего состава:

Буфер В305 1,5 мкл
 MgCl₂ (200mM) 0,15 мкл
 dNTP* (25 mM) по 0,15 мкл каждого
 Праймеры по 5 пмоль на пробу
 ДНК-полимераза *Taq*** по 0,4 мкл
 H₂O деионизованная до 15,0 мкл
 * - дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
 ** - вносили *ex tempore*

В каждую пробирку вносили по 14,8 мкл смеси и по 0,2 мкл пробы, содержащей фаг. ПЦР проводили на амплификаторе *Bio-Rad MJ Mini* по следующей программе:

1. предварительная денатурация при 94°C в течение 90 с;
2. 2 цикла: - денатурация – 94°C, 45 с; - отжиг — 61°C* (56°C)**, 60 с; - элонгация – 72°C, 120 с;
3. 28 циклов: - денатурация – 94°C, 15 с; - отжиг — 61°C* (56°C)**, 30 с; - элонгация – 72°C, 45 с.

* - для праймеров *MZia1* и *Cap8*

** - для праймеров *FR60* и *FR61*

После окончания амплификации полученную ДНК разделяли электрофоретически в 1,2% агарозном геле, приготовленном на *TBE*-буфере следующего состава:

Трис 50 mM
 Борная кислота 50 mM
 ЭДТА 5 mM
pH 8,3

Электрофорез проводили в горизонтальной ванночке (130x270x80 мм), в течение 40-60 мин при напряженности электрического поля 10-20 В/см. В лунки вносили по 2 мкл проб, предварительно смешивая с сигнальными красителями: бромфеноловым синим и ксиленцианолом. По окончании электрофореза гели с разделенной ДНК окрашивали в течение 15 мин в водном растворе бромистого этидия (2 мкг/мл). Фотографирование получившихся фрагментов проводили фотоаппаратом «*Kodak EDAS 290*» (экспозиция 6 с) в проходящем жёстком ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм).

По результатам ПЦР-анализа выяснилось, что среди 60 бактериофагов только 4 были положительны по гену 23, среди которых все положительны по гену 32. При этом T4-подобные фаги выделялись лишь из проб цыплят в возрасте 4, 10 и 68 дней.

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

Определение генов с высокой дифференциальной экспрессией при индукции ацетатом кортизона у штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

Фокина В.В., Брагин Е.Ю., Шутов А.А., Донова М.В.

ООО Фарминс, г. Пушкино, vvfokina@rambler.ru

Актинобактериальный штамм *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д эффективно осуществляет 1(2)-дегидрирование 3-кетостероидов, что определяет его практическую значимость в качестве промышленного биокатализатора для получения 1(2)-дегидроаналогов (RU 2156302; RU 2425052; RU 2447154; RU 2480475; RU 2532902). Штамм также проводит гидролиз ацетилированных стероидов, восстановление карбонильных групп при C17 и C20 андростанов и прегнанов, а также утилизирует стеринны и холаты (Fokina and Donova, 2003; Fokina et al., 2003, Фокина В.В. с соавт., 2003). Ранее нами было выполнено секвенирование и сборка полного кольцевого генома данного штамма (Shtratnikova et al., 2015) и проведён детальный биоинформатический анализ генома (Shtratnikova et al., 2016). Выявлено несколько кластеров генов, отвечающих за пути деградации стероидов, включая систему поглощения стериннов, окислительную деградацию алифатической боковой цепи, раскрытие и деградацию колец А/В и С/Д (Shtratnikova et al., 2015; Shtratnikova et al., 2016). Обнаружены ранее неизвестные кластеры генов, которые могли бы также принимать участие в метаболизме стероидных соединений.

В данной работе для доказательства функциональности предсказанных генов и оперонов проводили исследование дифференциальной экспрессии в условиях индукции 21-ацетатом кортексолона (АцК, 21-ацетокси-4-прегнен-17 α ,21-диол-3,11,20-трион). Это соединение широко используется для индукции 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназной (3-КСД) активности (Catroux et al., 1968; Fokina and Donova, 2003; Sukhodolskaya et al., 2017).

Поддержание и выращивание актинобактерий *N. simplex* проводили как описано ранее (Shtratnikova et al., 2016). Выделение РНК, пробоподготовку библиотек, секвенирование транскриптомов, первичную обработку чтений, первичный биоинформатический анализ осуществляли в соответствии с рекомендуемыми производителями протоколами и как описано ранее (Shtratnikova et al., 2017); поиск оперонов проводили с помощью FGenesB и Doors. Стероиды анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ как описано ранее (Sukhodolskaya et al., 2017).

При использовании АцК в качестве единственного источника углерода роста *N. simplex* не наблюдали (рост оценивали в контрольной минимальной среде, той же среде с 2% этанола и с 2% этанола и АцК). На 24 часа инкубирования число КОЕ в контроле, среде с этанолом и в среде с этанолом и АцК составило $2,4 \cdot 10^9 \pm 9,9 \cdot 10^8$; $2,1 \cdot 10^9 \pm 7,81 \cdot 10^8$ и $2,5 \cdot 10^9 \pm 5,2 \cdot 10^8$ клеток/мл среды, соответственно (рис 1А). В то же время, штамм осуществлял структурную модификацию АцК (рис. 1Б, 1В): основной продукт трансформации был идентифицирован как ацетат 1-дегидрокортексолона, мольный выход которого достигал 78% к 24 ч инкубации. Наряду с 1-дегидрированием наблюдалось частичное дезацетилирование субстрата и его 1-дегидроаналога с образованием кортексолона и 1-дегидрокортексолона.

Через 24 часа также наблюдали появление в следовых количествах 20 β -восстановленного 1(2)-дегидропроизводного (на схеме - 20 β -ОН- $\Delta^{1,2}$ -К).

Анализ дифференциальной экспрессии генов показал, что при индукции ацетатом кортизона значимого повышения экспрессии генов, участвующих в деградации стериннов, не наблюдается. Ярко выраженной кластеризации генов также не наблюдается: опероны, усиливающие экспрессию, равномерно распределены по геному. Ряд генов, повышающих экспрессию в ответ на добавление ацетата кортизона, можно объединить в четыре небольших кластера. Среди них разнообразные транспортёры, ферменты метаболизма

аминокислот и органических кислот, цитохромы, транскрипционные регуляторы, альдегид-дегидрогеназы, дегидрогеназа монооксида углерода, металл-содержащие ферменты, ферменты синтеза молибдоптерина, 2-нитропропан диоксигеназа. Среди генов, кодирующих ферменты катаболизма стероидов, максимальный уровень экспрессии в ответ на АцК отмечен для одной из 3-КСД (*KR76_27125*, *kstD2*): экспрессия этого гена увеличилась 1207 раз.

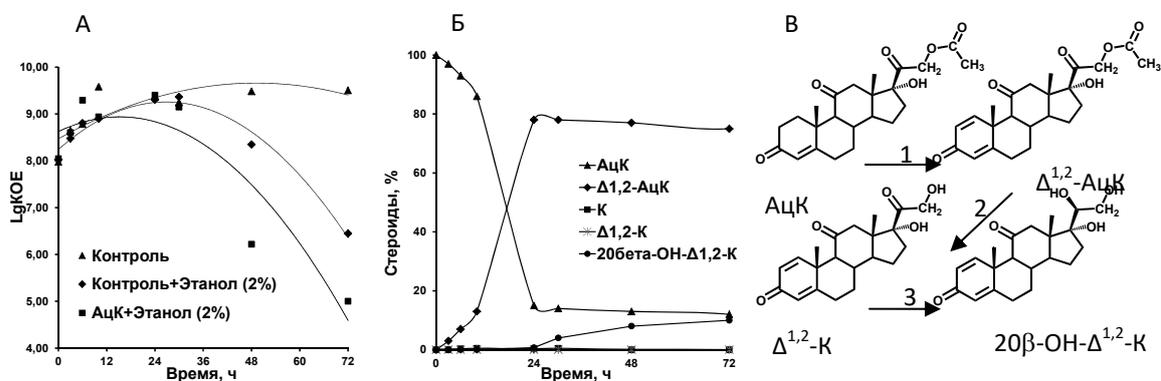


Рис. 1. А: Рост *N. simplex* на АцК (1 г/л) в минеральной среде, измеренный по числу КОЕ (на графике приведен десятичный логарифм КОЕ). Контроль – минеральная среда

Данные – среднее по трем измерениям. Б: Динамика биоконверсии ацетата кортизона

(1 г/л) культурой в минеральной среде с этанолом (2%). Данные – среднее по трем измерениям. В: Схема биоконверсии АцК. Обозначения на схеме: 1 – 1(2)-дегидрирование, 2 – дезацетилирование, 3- 20β-восстановление 20-кетогруппы.

Анализ дифференциальной экспрессии генов показал, что при индукции ацетатом кортизона значимого повышения экспрессии генов, участвующих в деградации стероидов, не наблюдается. Ярко выраженной кластеризации генов также не наблюдается: опероны, усиливающие экспрессию, равномерно распределены по геному. Ряд генов, повышающих экспрессию в ответ на добавление ацетата кортизона, можно объединить в четыре небольших кластера. Среди них разнообразные транспортёры, ферменты метаболизма аминокислот и органических кислот, цитохромы, транскрипционные регуляторы, альдегид-дегидрогеназы, дегидрогеназа монооксида углерода, металл-содержащие ферменты, ферменты синтеза молибдоптерина, 2-нитропропан диоксигеназа. Среди генов, кодирующих ферменты катаболизма стероидов, максимальный уровень экспрессии в ответ на АцК отмечен для одной из 3-КСД (*KR76_27125*, *kstD2*): экспрессия этого гена увеличилась 1207 раз.

Таким образом, высокий уровень 1(2)-дегидрирования 3-кетостероидов штаммом *N. simplex* объясняется высоким уровнем индукции 3-КСД.

Среди генов, продукты которых предположительно катализируют восстановление карбонильных групп стероидов при С20, в присутствии АцК увеличивалась экспрессия одного (гомолог *KR76_13560*, 3-альфа или 20-бета-гидроксистероид дегидрогеназа).

Результаты расширяют представления об особенностях структурной модификации стероидов *N. simplex* и их генетическом контроле и важны для метаболической инженерии актинобактерий.

Благодарности: Работа поддержана ФЦП Минобрнауки России, Соглашение №14.588.21.0008

Литература

- Патент RU 2156302. 2000.
- Патент RU 2425052. 2011.
- Патент RU 2447154. 2012.
- Патент RU 2480475. 2013.
- Патент RU 2532902. 2014.
- Fokina VV, Donova MV (2003) J Steroid Biochem Mol Biol 87:319–325.
doi:10.1016/j.jsbmb.2003.10.002
- Fokina VV, Sukhodolskaya GV, Baskunov BP, et al. (Steroids 68:415–421.
doi:10.1016/S0039-128X(03)00043-6
- Фокина В.В., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., с соавт. (2003) Микробиология. № 1, т. 72, стр. 33-39.
- V.Y. Shtratnikova, M.I. Schelkunov, Y.A. Pekov et al., (2014) Genome Announcements; 3(1): e01406-14; doi:10.1128/genomeA.01406-14
- Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., et al., (2016) Current Genetics, 62(3):643-56. doi: 10.1007/s00294-016-0568-4
- Sukhodolskaya G., Fokina V., Shutov A., et al., (2016) Steroids. 118: 9-16.
doi:10.1016/j.steroids.2016.11.001
- V.Y. Shtratnikova, M.I. Schelkunov, D.V. Dovbnaya et. al., (2017) Appl Microbiol Biotechnol 101:4659–4667 doi:10.1007/s00253-017-8288-3
- Catroux Y., Fournier J., Blachere H. Can. J. Biochem., 1968, v. 46, 537-542

Изучение способов стабилизации мембранных белков на примере реакционного центра пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*

Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Габдулхаков А.Г., Шувалов В.А.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино
tat-fufina@yandex.ru

В работе изучена возможность стабилизации мембранного белка – реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* с использованием двух подходов. Первый – стабилизация с использованием дисахаридов (трегалоза, сахароза и мальтоза) в комбинации с различными детергентами (ЛДАО, Тритон-Х100, бета-октилгликозид) в составе буферного раствора. Второй – направленные аминокислотные замены в *ruf*-опероне, которые приводят к образованию дополнительных водородных связей между белковым компонентом и кофактором переноса электронов и внутри белковой альфа-спирали. На примере изолированных реакционных центров дикого типа нами показано, что использование дисахаридов в составе буферного раствора стабилизирует пигмент-белковых комплексов. Все изученные дисахариды способствовали повышению термостабильности реакционных центров. Однако наибольший эффект был достигнут при комбинации мальтозы и бета-октилгликозида.

Также нами была исследована термостабильность у генетически модифицированных реакционных центров с одиночными и двойными аминокислотными замещениями. Было показано, что добавление аминокислотных остатков гистидина в положениях M197 и M196 реакционного центра способствуют повышению термостабильности пигмент-белкового комплекса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-44-500828 и частичной поддержке РФФ №14-14-00789

Бактерии рода *Bacillus*: роль в природе и области применения человеком

Черепанова Е.А., Латыпова Г.Ю.¹, Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

¹ Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, г. Уфа,
k_cherepanova@mail.ru

Виды *Bacillus* представляют собой аэробные спорообразующие бактерии, которые широко распространены и встречаются повсеместно. Они устойчивы к враждебным физическим и химическим состояниям, различные виды обладают необычными физиологическими свойствами, которые позволяют им выживать или процветать в суровых условиях: от пустынных песков и горячих источников до арктических почв и от пресных вод до морских осадков. Род включает в себя термофильные (*B. thermophilus*), психрофильные, ацидофильные (*B. acidocaldarius*), алкалофильные (*B. alcalophilus*), галотолерантные и галофильные (*B. halodurans*) представители, которые способны расти при температурах, значениях pH и концентрациях солей, при которых выживают немногие другие организмы [1]. В этот род входят как свободноживущие, так и симбиотические виды, в редких случаях патогенные. Из патогенных наиболее известен возбудитель сибирской язвы (*B. anthracis*) у позвоночных животных и энтомопатогенные виды (*Bacillus larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* и *B. thuringiensis*). Ряд других видов, в частности *B. cereus*, являются случайными патогенами людей и скота, но большинство видов *Bacillus* являются безвредными сапрофитами, эндосимбионтами и пробиотиками, полезными для организма хозяина.

Многие виды рода *Bacillus* обладают антагонистическими свойствами и вырабатывают антибиотики различной природы, гормоны и гормоноподобные соединения [2]. Ещё в 1965 г. Katznelson и Cole установили наличие гиббереллинов в культуральной жидкости *B. cereus* и *B. subtilis*, и с тех пор исследователями обнаружены многочисленные штаммы бактерий рода *Bacillus*, способные к синтезу этого фитогормона [3]. Синтез бактериями *B. subtilis* FZB24 ауксинов стимулирует развитие корневой системы, что позволяет растениям более активно поглощать воду и питательные вещества и помогает им ускоренно проходить чувствительные к патогенам стадии развития [4]. Кроме того, бактерии-эндосимбионты растений защищают растения-хозяев от действия поллютантов, обеспечивают их элементами минерального питания и защищают от болезней, патогенов и даже вредителей [5].

Виды *Bacillus* используются во многих медицинских, фармацевтических, сельскохозяйственных и промышленных процессах, которые используют их широкий спектр физиологических характеристик и их способность производить множество ферментов, витаминов, антибиотиков, иммуноактивных факторов и других метаболитов. Управлением по контролю за качеством лекарственных и продовольственных средств США, *B. subtilis* был присвоен Статус Generally regarded as safe (GRAS), что позволяет его применять как вполне безопасный микроорганизм в медицинских целях, в сельском хозяйстве и ветеринарии. Этот вид является основой ряда препаратов для животных. Например, Бактерин-СЛ, Эндоспорин, Протексин, Энтеробактерин широко применяют в ветеринарии, животноводстве, птицеводстве и рыбоводстве для борьбы с болезнетворными бактериями, ленточными червями и для повышения иммунитета. *B. subtilis* входят в состав многих пищевых добавок (БАД), например, Супрадин Киндер гель, Ветом, Бактистатин и другие, а также являются основным действующим веществом многих лекарственных препаратов. Их применяют при острых кишечных инфекциях у детей, при дисбактериозе кишечника, в послеоперационный период для профилактики нагноений и так далее. Наиболее часто основой лекарств служит штамм *Bacillus subtilis* 534 (препарат Споробактерин) или полученный из него селективным путем штамм

Bacillus subtilis ЗН (препарат Бактиспорин). Их ценность особенно велика в борьбе с бактериальной инфекцией, когда больному по тем или иным причинам нельзя принимать антибиотики.

Некоторые патогены насекомых рода *Bacillus* используются в качестве активных компонентов инсектицидов. В список микробиологических средств, рекомендуемых в России для борьбы с колорадским жуком, входит ряд препаратов на основе штаммов *B. thuringiensis* [6]. Действующим началом в них являются β -экзотоксин в препарате Битоксибациллин, производимом на основе штаммов *B. subsp thuringiensis*, и *Coleoptera* специфический δ -эндотоксин (инсектицидный белок СгуЗА-типа) в препаратах Новодор, Децимид и Колорадо, получаемых на основе штаммов *Bt subsp. morrisoni*. С момента своего открытия около века назад, *B. thuringiensis* использовался как биопестицид в области сельского хозяйства, лесного хозяйства и борьбы с комарами из-за его преимуществ специфическая токсичность в отношении целевых насекомых, отсутствие загрязняющих остатков и безопасность для нецелевых организмов. Сегодня *B. thuringiensis* является самым успешным коммерческим микробным инсектицидом, включающим около 90% рынка биопестицидов. Энтотоцидные свойства этой бактерии объясняются наличием инсектицидных кристаллических белков.

В связи с необходимостью перехода человечества к биологическому земледелию, интенсивно разрабатываются методы биологической защиты растений от болезней и соответствующие биопрепараты, призванные минимизировать применение химических пестицидов [3]. Бактерии рода *Bacillus* весьма перспективны в качестве компонентов биоудобрений, поскольку образуют споры, длительно сохраняющие жизнеспособность и устойчивые к повреждающим воздействиям, кроме того, эти бактерии способны повышать доступность для растений элементов питания в почве, а также подавлять развитие фитопатогенных грибов [7]. Так, фитозащитные свойства доказаны для *Bacillus subtilis* 26Д препарата Фитоспорин-М (Башинком, Россия), для *Bacillus amyloliquefaciens* FSB-24 -RhizoPlus (AbiТер GmbH, ФРГ) и Taegro (Novozyme, Дания), *B. amyloliquefaciens* IN937a -BioYield® (Gustafson, США), *B. pumilus* QST 2808 - Ballad+ (AgraQuest Inc., USA) [8]. Их преимуществом является способность избегать конкурентного давления со стороны аборигенных видов, чему в сильной степени подвергаются другие свободно живущие микроорганизмы, искусственно привносимые в агробиоценозы. В целом в биологической защите эти микроорганизмы используют все чаще и чаще, так как они устойчивы к различным условиям среды, способны к быстрому размножению и обладают широкой антагонистической активностью [9].

Некоторые виды *Bacillus* важны для естественной или искусственной деградации отходов. На основе этих спорообразующих аэробных бактерий успешно создают суперэффективные продуценты разных биологически активных веществ. Так, например, *B. subtilis* является важнейшим продуцентом амилаз и протеиназ. Бацитрацин и полимиксин являются двумя хорошо известными антибиотиками, полученными из видов *Bacillus*.

Споры облигатного термофила *B. stearothermophilus* используются в качестве основы биологического индикатора для контроля эффективности процесса стерилизации паром под давлением в автоклаве, а *B. subtilis subsp globigii*, который устойчив к теплу, химическим веществам и радиации, широко используется для проверки альтернативных методов стерилизации и фумигации.

Представители рода *Bacillus* часто используются в генной инженерии в качестве хозяев для клонирования ДНК и продукции в их клетках чужеродных белков. Преимуществами бацилл как хозяев для клонирования ДНК является высокая изученность генома многих видов, способность секретировать интактные белки в окружающую среду, нетребовательность большинства видов к питательной среде, высокая технологичность, а также возможность длительного хранения промышленных штаммов в виде высушенных спор.

Таким образом, род *Bacillus* можно охарактеризовать как уникальный, учитывая его распространенность и экологическую роль в функционировании экосистем, а также широту применения в различных сферах человеческой жизни.

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 17-29-08014 (2018)

Литература

1. Review of: Microbiology: An Evolving Science, 2nd ed.; Joan L Slonczweski and John W. Foster; W.W. Norton & Company, New York NY. 2011. 1096 pages.
2. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2006. Т. 42. № 3. С. 261-268
3. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Coh. в агроэкосистемах Москва: Наука, 2007. 147 с.
4. Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmeiedeknecht G., Hain R. FZ B 24@ *Bacillus subtilis* – mode of action of microbial agent enhancing plant vitality // Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2000. V. 1. P. 72-93.
5. Rosenblueth M., Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts // Mol. Plant–Microbe Interact. 2006. V. 19. P. 827–837.
6. Добрица А. П., Корецкая Н. Г., Гайтан В. И., Коломбет Л. В., Дербышев В. В., Жиглецова С. К. Разработка биопестицидов против колорадского жука // Рос. хим. ж. 2001. Т. 45, N 5-6. С. 174-184.
7. Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological application of *Bacilli* in agriculture. Curr. Opin. Biotechnol. 2011. 22: 1-7.
8. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Липопептиды эндофитов и фитоиммунитет: перспективы практического использования// Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 57-61.
9. Максимов И.В., Максимова Т.И., Сарварова Е.Р., Благова Д.К. Эндофитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения (обзор). //Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. №. 2. С. 134-148.

Транскрипционная и трансляционная регуляция гена холина бактериофага T5

Чернышов С.В.¹, Масулис И.С.², Шадрин В.С.¹, Микулинская Г.В.¹

¹ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ² Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН
г. Пущино, svch2@rambler.ru

Лизис бактериальной клетки бактериофагами, развивающимися по литическому пути, осуществляется с помощью фагоспецифических белков, основными из которых являются эндолизин, разрушающий пептидогликан клеточной стенки, и холин, обеспечивающий доступ эндолизина к муреину путем образования во внутренней мембране пор, размер которых зависит от типа холина. Холины – токсичные мембраносвязанные белки, накапливающиеся в мембране постепенно, пока в строго определенное время не произойдет триггерный сброс потенциала внутренней мембраны. Благодаря своей регуляции именно холины являются теми «часами», которые регулируют наступление лизиса. Как правило, механизм регуляции холинов посттрансляционный и включает белки-антихолины. Чаще всего антихолины – это аналоги холина, удлиненные на несколько аминокислот за счет двойного старта трансляции (Young, 2013). Но у холина бактериофага T4 нет двойного старта, а два его антихолина, RI и RIII, – совершенно

другие белки, один из которых связывается с холином в цитоплазме, а второй – в периплазме, регулируя время лизиса (Chen and Young, 2016).

Холин бактериофага T5 относится к холинам T4-типа и обладает N-концевым мембраносвязанным доменом и большим C-концевым периплазматическим доменом размером около 20 кДа. В геноме фага T5 ген холина находится в одном опероне перед геном эндолизина, причем терминирующий и иницирующий кодоны их генов перекрываются. Несмотря на существенную гомологию холинов фагов T5 и T4, анализ генома бактериофага T5 не выявляет гомологов антихолинов бактериофага T4. Однако в регуляторной области холин-эндолизинового оперона бактериофага T5 есть нечто похожее на механизм двойного старта: два потенциальных иницирующих кодона в одной рамке считывания. Один из них – канонический ATG, а второй – редко используемый и менее эффективный TTG, отделенный от первого 8 триплетами и в норме кодирующий лейцин (рис. 1). Также в «upstream» области холина имеется два потенциальных промоторных участка, предполагающих различную эффективность инициации транскрипции. Целью данной работы явилось изучение механизмов регуляции экспрессии гена холина бактериофага T5 на транскрипционном и трансляционном уровне.

Анализ нуклеотидной последовательности перед геном холина позволил аннотировать наиболее вероятные сигналы инициации транскрипции: консенсусные последовательности “-10” и “-35” для промотора, узнаваемого РНК-полимеразой *E.coli* (рис. 1). Что касается старта трансляции, то для канонического кодона ATG не было обнаружено последовательности Шайна-Дальгарно, хотя известны случаи эффективной трансляции (-SD)-мРНК. Перед неканоническим кодоном TTG на расстоянии 6 нуклеотидов такая последовательность была найдена (AGGAGGT). Использование кодона ATG представлялось маловероятным еще и потому, что он перекрывается с “-10” областью вероятного промотора. Однако нами допускалась возможность существования альтернативного промотора, расположенного выше аннотированного, и образования более длинного транскрипта.

-35

СТTGACAACGACATAATTTTATGCTCCAAGTGTAACATTTAAAAACCCA**TTGAAATT**
TT

-10 M V L V R G G Y K L(M) E K F

ССТССААААТТАГ**ТАТААТ**ГГТАСТГГТТАГ**АГГАГГ**ТТАСААА**ТТ**ГГААААГТТСТ
SD

Рис.1. Регуляторные сигналы транскрипции и трансляции гена холина бактериофага T5. SD – последовательность Шайна-Дальгарно. -10, -35 – области промоторов РНК-полимеразы *E.coli*.

С целью тестирования промоторной активности два фрагмента ДНК «upstream» области гена холина, длиной 130 и 300 п.н., были интегрированы в векторную плазмиду pPF1 (Masulis et al., 2015), предназначенную для поиска и оценки эффективности разнонаправленных промоторов по уровню экспрессии генов красного и зелёного флуоресцентных белков. Удлиненный фрагмент “300” был использован для проверки предположения о вероятной промоторной активности удаленной от TTG-кодона промотороподобной области. Был отобран ряд клонов, содержащих рекомбинантные конструкции и обладающих либо только красной (плазмиды pPF1-130R и pPF1-300R), либо только зелёной флуоресценцией (плазмиды pPF1-130G и pPF1-300G), что является свидетельством действия промотора только в одном направлении. Оценка активности промотора холинового гена и определение стартовой точки его транскрипции были проведены в реакции обратной транскрипции мРНК из клеток *E.coli*, трансформированных конструкциями pPF1-130G, pPF1-300G и pET28-start2-GFP. В обеих плаزمиды pPF1 в исследуемой области зарегистрирован эффективный старт транскрипции в положении -20 относительно иницирующего кодона TTG, которому соответствует аннотированный промотор. В конструкции pET28-start2-GFP высокой

активностью обладает этот же промотор (продукт 79 п.н.). Таким образом, была установлена единственная точка инициации транскрипции.

Для определения старта трансляции гена холина были созданы рекомбинантные генетические конструкции, в которых методом ПЦР-лигирования ген зелёного флуоресцентного белка *egfp* был интегрирован со стартовыми кодонами ATG (старт 1) и TTG (старт 2) с сохранением, таким образом, регуляторных элементов инициации транскрипции и трансляции гена холина. Клонирование осуществляли в векторной плазмиде pET28b по сайтам рестрикции *Bgl*III и *Xho*I, удалив из неё тем самым промоторную последовательность бактериофага T7. Было показано, что способностью к флуоресценции обладали исключительно клоны, содержащие конструкцию со стартовым коконом TTG (плазмида pET28-start2-GFP).

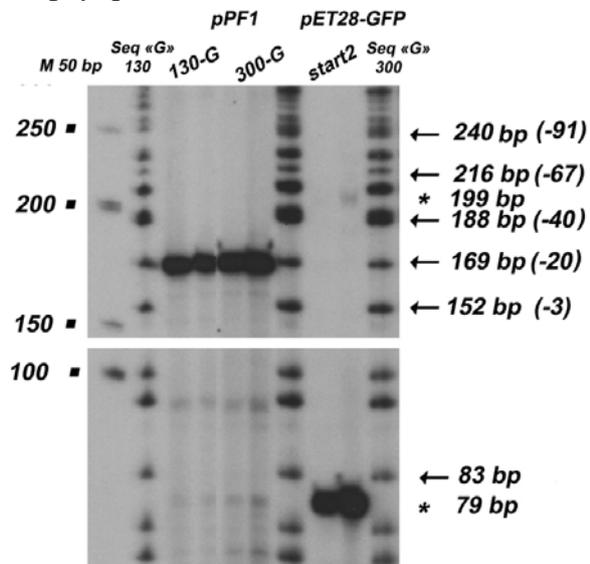


Рис. 2. Авторадиограмма продуктов реакции обратной транскрипции с радиоактивно-меченым геноспецифичным праймером к *egfp* тотальной РНК, выделенной из клеток *E.coli* K12 MG 1655, трансформированных плазмидами pPF1 (130G и 300G) и pET28-GFP-start2. Звездочками указан размер продуктов, полученных для конструкции start2. Продукты разделяли в 6% ПААГ с 8М мочевиной; нанесены по 2 повторности.

Таким образом, в результате работы были локализованы точки инициации транскрипции и трансляции гена холина бактериофага T5. На основании полученных данных можно сделать вывод, что регуляция экспрессии гена холина происходит не на транскрипционном, а на трансляционном уровне, что предполагает дальнейший анализ трансляционных сигналов.

Литература

1. Young R. Curr Opin Microbiol. 2013. V. 16. P. 790-797. doi: 10.1016/j.mib.2013.08.008.
2. Chen Y., Young R. J Bacteriol. 2016. V. 198. P. 2448-2457. doi: 10.1128/JB.00294-16.
3. Masulis I.S., Babaeva Z.S., Chernyshov S.V., Ozoline O.N. 2015. Sci Rep. 5:11449.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492

Исследование спектра бактериолитического действия пептидогликангидролаз колифагов T5, RB43 и RB49

Шадрин В.С.¹, Чернышов С.В.¹, Дорофеева Л.В.², Микулинская Г.В.¹

¹ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, valerian94@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Лизис бактериальных клеток изнутри при литическом пути развития бактериофага осуществляется с помощью фагоспецифических белков: холина, который пермеабиллизует

внутреннюю мембрану, и эндолизина – фермента, гидролизующего пептидогликановый слой клеточной стенки. Эндолизины способны действовать на клеточную стенку грамположительных бактерий извне, разрушая пептидогликан, что способствует осмотическому лизису клеток и их гибели. Механизм действия эндолизинов отличен от антибиотиков, и потенциально они являются альтернативным антибактериальным средством, что особенно актуально в случаях антибиотикорезистентных патогенов. На данный момент эндолизины используются в защите сельскохозяйственных растений, профилактике бактериальных заражений продуктов питания, а также как лекарственные средства наружного применения. Бактериоспецифичность эндолизинов может быть широкой и включать несколько родов бактерий, а также узкой – к конкретному бактериальному штамму. Бактериоспецифичность фагов не обязательно коррелирует с таковой его эндолизинов.

Объектом данного исследования является группа эндолизинов колифагов RB49, RB43 (*Myoviridae*) и T5 (*Siphoviridae*). Эти ортологичные белки имеют небольшой размер (14-15 кДа), обладают высокой конформационной стабильностью, достаточно термоустойчивы и активны в широком диапазоне значений pH: 7.0-9.0 (Mikoulinskaia et al., 2018). Все они представляют собой цинксодержащие L-аланоил-D-глутаматпептидазы семейства M15 и эффективно гидролизуют пептидогликан грамотрицательных бактерий, который относится к одному типу (A1 γ) по классификации Шлейфера (Schleifer & Kandler, 1972). Пептидогликан грамположительных бактерий, согласно той же классификации, имеет большое число типов, которые определяются вариациями в строении пептидной субъединицы и межпептидного мостика. Поскольку гидролизуемая изучаемыми ферментами связь (L-Ala-D-Glu) есть у всех бактерий с пептидогликаном A-типа строения (а таких бактерий подавляющее большинство), то исследуемые эндолизины могут обладать широкой бактериоспецифичностью, что увеличивает их биотехнологический потенциал.

Целью работы явилось изучение спектра бактериолитического действия трех эндолизинов (EndoRB49, EndoRB43, EndoT5) в зависимости от химического строения пептидогликана, а также стадии роста бактериальной культуры.

Выделение и очистку ферментов из клеток штаммов-продуцентов вели с помощью хроматографических методов; в результате были получены электрофоретически гомогенные рабочие препараты EndoRB49, EndoRB43, EndoT5. Был осуществлен скрининг бактерий с различным типом строения пептидогликана на предмет гидролиза их клеточных стенок исследуемыми ферментами. Бактерии выращивали в виде суспензионных культур на среде LB. Всего было проанализировано 13 видов бактерий с пептидогликаном разных типов (Таблица 1). Среди них было обнаружено 4 вида грамположительных бактерий, которые подвержены лизису хотя бы одним из исследуемых ферментов.

На следующем этапе работы были количественно определены значения удельной литической активности на отобранных штаммах бактерий в зависимости от фазы роста (Таблица 2). Активность определяли спектрофотометрически в 25 мМ Трис-HCl буфере (pH=8.0), содержащем 37.5 мМ NaCl и 0.1% Тритон-X100. За единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающее убывание оптической плотности суспензии бактериальных клеток на 1 ОЕ в минуту при длине волны 450 нм в 1-сантиметровых кюветах.

Табл. 1. Подверженность лизису EndoRB49, EndoRB43, EndoT5 бактерий с различным строением пептидогликана. HEWL (hen egg white lysozyme) – мурамидаза куриного яйца (контроль). Звездочкой отмечены клетки, пермеабелизованные хлороформом.

Вид бактерии	Тип пептидогликана	Endo RB49	Endo RB43	Endo T5	HEWL
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	A1 α	-	-	-	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	A1 γ (амид. Glu)	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	A1 γ (амид. mDpm)	+	+	-	+
<i>B. megaterium</i>	A1 γ (неамид.)	+	+	+	+
<i>Escherichia coli B*</i>	A1 γ (неамид.)	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	A1 γ (амид. Glu и mDpm)	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	A2	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	A3 α	-	-	-	-
<i>Terrabacter tumescens</i>	A3 γ	-	-	-	+
<i>L. rhamnosus</i>	A4 α	-	-	-	-
<i>Cellulomonas flavigena</i>	A4 β	+	-	-	-
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	A4 γ	-	-	-	+
<i>Clavibacter michiganensis</i>	B2 γ	-	-	-	-

Таб. 2. Количественный анализ удельной активности EndoRB49, EndoRB43, EndoT5 на клетках бактерий в экспоненциальной (Exp) и стационарной (Stac) фазах роста культуры (ед/мг белка). Звездочкой отмечены клетки, пермеабилizованные хлороформом

Вид	Endo RB49		Endo RB43		Endo T5	
	Exp	Stac	Exp	Stac	Exp	Stac
<i>Escherichia coli B*</i>	NM	3450 \pm 493	NM	16197 \pm 4651	NM	3114 \pm 783
<i>Bacillus licheniformis</i>	620 \pm 118	169 \pm 64	369 \pm 143	66 \pm 22	46 \pm 15	-
<i>Bacillus subtilis</i>	527 \pm 210	366 \pm 145	42 \pm 7	33 \pm 12	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	352 \pm 128	76 \pm 31	175 \pm 65	82 \pm 23	106 \pm 40	58 \pm 24

В результате работы было показано, что 4 вида грамположительных бактерий подвержены лизису исследуемыми L-аланоил-D-глутаматпептидазами; три из них – бактерии рода *Bacillus*, имеющие пептидогликан типа A1 γ , при этом у двух из них субстрат амидирован в разных положениях. Четвертая бактерия, подверженная лизису, имеет пептидогликан типа A4 β . Таким образом, можно сделать следующие выводы: 1) бактериоспецифичность эндолизинов EndoRB49, EndoRB43, EndoT5 существенно шире, чем у соответствующих фагов; 2) не существует прямой зависимости бактериоспецифичности пептидогликангидролаз от химического строения пептидогликана; 3) большое влияние на лизис оказывает стадия роста культуры: максимальная скорость гидролиза наблюдается на культурах бактерий, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

Литература

1. Mikoulskaia G.V., Chernyshov S.V., Shavrina M.S., Molochkov N.V., Lysanskaya V.Y., Zimin A.A. J Gen Virol. 2018. Feb 1. doi: 10.1099/jgv.0.001014.
2. Schleifer K.H. & Kandler O. Bacteriol Rev. 1972. V. 36. P. 407–477.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492

Влияние ионов металлов на обесцвечивание трифенилметановых красителей бактериями рода *Azospirillum*

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

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов, andrejsh93@gmail.com

Синтетические красители широко используются в различных отраслях легкой промышленности. Вследствие недостаточной результативности процессов индустриальной окраски, большой процент красителей попадает в сточные воды предприятий в неизменном виде, что является причиной активной контаминации окружающей среды данными соединениями. Красители трифенилметанового ряда – производные трифенилметана, содержащие в бензольных кольцах amino- или гидроксигруппы, большинство из них является токсичными, аллергенными и канцерогенными. На сегодняшний день способность к биоразложению трифенилметановых красителей показана для некоторых бактерии и грибов, являющихся продуцентами ферментов фенолоксидазных и лигнинолитических комплексов, в том числе и для почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*. Многие факторы способны индуцировать и ингибировать эффективность биodeградации, в частности ионы металлов, действие которых опосредуется как влиянием (в том числе и токсическим) непосредственно на биообъекты, так и на ферментативные системы, вовлеченные в процессы обесцвечивания. В сточных водах присутствуют ионы различных металлов и поскольку биоремедиация промышленных стоков представляет несомненный интерес, необходимо исследовать их влияние на процесс биоредукции. Целью работы явилось изучение влияния ионов металлов на обесцвечивания трифенилметановых красителей бактериями рода *Azospirillum*.

В работе использованы штаммы бактерий рода *Azospirillum*: *A. brasilense* Sp245, и SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой малатно-солевой среде, pH=6,8 при температуре 30°C. В качестве модельного трифенилметанового красителя был выбран – малахитовый зеленый (тетраметил-4,4-диаминотрифенилметан). В условиях эксперимента культивирование проводилось при внесении красителя в конечной концентрации 0,01 мМ, и солей металлов (MnSO₄, CaCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, CuSO₄, NaCl) в концентрации 1, 5 и 10 мМ. Степень обесцвечивания анализировали спектрофотометрически через 7 суток выращивания и рассчитывали по формуле: $\frac{A_{\text{нач}} - A_{\text{кон}}}{A_{\text{нач}}}$, где $A_{\text{нач}}$ – начальное поглощение, а $A_{\text{кон}}$ – конечное поглощение. Изменение эффективности биodeградации выражали в процентах от контроля (биodeградация без внесения ионов металлов).

Была установлена способность выбранных штаммов к обесцвечиванию малахитового зеленого, для *A. brasilense* Sp245 степень деградации красителя на 7 сутки культивирования составила 70%, для *A. brasilense* SR80 – 91%. Результаты проведенного исследования показали, что присутствие в среде культивирования ионов тяжёлых металлов Zn²⁺ и Cu²⁺ снижает эффективность биodeградации красителя на 80-100%, при этом отмечается концентрационная зависимость, данный факт справедлив как для *A. brasilense* Sp245, так и для SR80. Стоит отметить, что при культивирований *A. brasilense* Sp245 в присутствии 1 мМ ZnSO₄ обесцвечивание красителя не происходило вовсе, хотя полное ингибирование бактериального роста установлено не было. Ионы Mn²⁺ оказывали влияние на процесс обесцвечивания только при высоких концентрациях, а именно внесение 10 мМ раствора MnSO₄ снижало биodeградацию на 50%. Присутствие CaCl₂, и NaCl в выбранных концентрациях не оказывало существенного влияния на способность азоспирилл к деструкции малахитового зеленого. Ионы Mg²⁺ разнонаправленно влияли на

способность к обесцвечиванию красителя *A. brasilense* Sp245 и SR80, если культивирование Sp245 в присутствии MgSO₄ повышало эффективность биodeградации на 10%, то для штамма SR80 отмечалось снижение степени деструкции на 18-36% в зависимости от концентрации.

Было проведено исследование, влияния нескольких ионов металлов, обычно встречающихся в текстильных сточных водах, на эффективность биodeградации азоспириллами малахитового зеленого.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00008 мол_а.

Таксономическая структура бактериальной компоненты микробного сообщества промышленной биогазовой установки на двух стадиях сбраживания сложного субстрата

Яценко В.А.¹, Ключева В.В.¹, Ходжаев Ю.Р.¹, Бояршин К.С.¹, Мейлах И.К.^{2,3}, Бредихин В.П.^{2,3}, Батлуцкая И.В.¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»)

²Общество с ограниченной ответственностью «АльтЭнерго»

³Акционерное общество «Белгородский институт Альтернативной энергетики», г. Белгород; kboyarshin@mail.ru

Производство биогаза получает всё большее распространение в регионах страны, где активно функционирует агропромышленный комплекс и производится большое количество органических отходов и субпродуктов. В его основе лежит технология анаэробного сбраживания субстратов, ключевую роль в которой играют метаногенные микробные сообщества, спонтанно складывающиеся в рабочих емкостях биогазовой установки на основе микрофлоры поступающего сырья.

Метаногенез осуществляется археями, находящимися в отношениях синтрофии с различными таксонами эубактерий, перерабатывающих исходные составляющие субстрата [Enzmann 2018]. Структура бактериальной компоненты сообщества наиболее разнообразна – скажем, в подробном исследовании мезофильного метаногенного сообщества, сбраживающего свиные навозные стоки, было показано преобладание таксономического разнообразия эубактерий над разнообразием архей в 3-7 раз [Pampillón-González 2017]. Разнообразие сбраживаемых субстратов существенно сказывается и на таксономической структуре эубактериальной компоненты сообществ [Sun 2016].

В настоящей работе мы анализировали таксономический состав эубактерий в метаногенном сообществе биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» на севере Белгородской области. Её биогазовая установка включает две зоны, пространственно разделённые и обеспечивающие раздельное прохождение двух различных стадий сбраживания субстратов. Образцы сбраживаемой массы из обеих зон были отобраны в сентябре 2017 г. в количестве по 0,5 л и хранились в замороженном состоянии при -20 °С. Сбраживаемая масса (смесь субстратов в процессе их ферментации) включала свиноводческие навозные стоки, кукурузный силос, мясные отходы, сахаросвекольный жом и другие органические компоненты в измельчённом состоянии. Суммарную ДНК выделяли при помощи набора «FastDNA Spin kit for Soil» фирмы «MPbio».

На основании литературных данных [Yang 2015] нами были использованы таксон-специфические пары праймеров для детекции микроорганизмов, относящихся к типам *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, *candidatus Saccharibacteria*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, и трём классам типа *Proteobacteria* – *Beta*-, *Gamma*-, *Epsilonproteobacteria*. Для проведения ПЦР РВ использовали реакцию смесь

производства ЗАО «Синтол» (лот М-427). Смеси объемом по 25 мкл содержали по 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, по 7,5 мкл растворов праймеров, добавляемых до конечной концентрации 0,33 пмоль/мкл каждого, 2 мкл препарата ДНК-матрицы и 5,5 мкл деионизированной воды. Таким образом, реакции велись с использованием рекомбинантной ДНК-полимеразы SynTaq при pH 8,8, в присутствии 2,5 mM MgCl₂, с детекцией продукта по флуоресценции красителя SYBR Green I. Программа термоциклера для ПЦР РВ «CFX96 Touch» фирмы «Bio-Rad» содержала этап плавления ДНК и активации ДНК-полимеразы при температуре 96 °С продолжительностью 5 мин. За ним следовали 40 циклов амплификации, включавшие по три этапа продолжительностью 20 сек: плавления при 96 °С, отжига праймеров при 60 °С и элонгации растущей цепи при 72 °С. Обсчёт полученных данных проводили по методу, предложенному в литературном источнике [Vacchetti De Gregoris 2011], по формуле

$$X = \frac{A_{(Uni)}^{Cq(Uni)}}{A_{(X)}^{Cq(X)}} \cdot 100\%$$

где X – процентная доля ДНК определённого таксона бактерий среди всей бактериальной ДНК, A – факторы амплификации для универсальной пары праймеров (Uni), специфичной к ДНК царства бактерии, и пары праймеров, специфичной к ДНК данного таксона (X), Cq – число циклов амплификации, необходимое для достижения порогового значения, установленного программным обеспечением амплификатора в том и другом случае. Полученные результаты представлены в таблице:

Таксон микроорганизмов	Ранг таксона	% в сообществе	
		Ранняя стадия	Поздняя стадия
<i>Firmicutes</i>	тип	60	78
<i>Bacteroidetes</i>	тип	14	12
<i>Gammaproteobacteria</i>	класс	9,1	2,8
<i>Sacharibacteria</i>	тип	0,36	-
<i>Betaproteobacteria</i>	класс	0,13	0,02
<i>Actinobacteria</i>	тип	0,01	-
Остальные	-	16	7,1
Всего	-	100	100

Согласно представленным данным, среди зубактериальной компоненты сообщества наблюдается выраженное доминирование типа *Firmicutes*. Этот таксон, в частности, включает молочнокислых бактерий (отряд *Lactobacillales*), входящих в микрофлору кукурузного силоса и навозных стоков – основных субстратов процесса. На поздней стадии сбраживания, в период усиления роли метаногенных архей, разнообразие зубактерий снижается и доминирование фирмикут усугубляется, что, по-видимому,

отражает снижение разнообразия экологических ниш для представителей эубактерий. Выявленные существенные изменения структуры эубактериальной компоненты метаногенного сообщества в ходе процессов анаэробного сбраживания подчёркивают возможность дальнейшей детализации динамики структуры сообщества.

Литература

1. Bacchetti De Gregoris T.B., Aldred N., Clare A.S., Burgess J.G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa // Journal of Microbiological Methods. V. 86. P. 351–356. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.010
2. Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications // AMB Express, 2018, 8, 1. doi:10.1186/s13568-017-0531-x
3. Pampillón-González L., Ortiz-Cornejo N.L, Luna-Guido M., Dendooven L., Navarro-Noya Y.E. Archaeal and bacterial community structure in an anaerobic digestion reactor (Lagoon Type) used for biogas production at a pig farm // J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2017, 27, 306-317. doi:10.1159/000479108
4. Sun L., Liu T., Müller B., Schnürer A. The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests // Biotechnology for Biofuels, 2016, 9, 128. doi:10.1186/s13068-016-0543-9
5. Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C. 2015. Use of 16S rRNA Gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces // Applied and Environmental Microbiology. V. 81. N. 19. P. 6749-6756. doi: 10.1128/AEM.01906-15

Выщелачивание металлов из стекловидных шлаков силикатными бактериями

Абашина Т.Н.^{1,2}, Делеган Я.А.¹, Яцкив А.А.^{1,2}, Вайнштейн М.Б.^{1,2}, Kumar S.³

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино
vain@ibpm.pushchino.ru

² ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

³ Department of Biotechnology and Bioinformatics, Jaypee University of Information Technology, Wazirpur, Solan, India

Биовыщелачивание минерального сырья с помощью микроорганизмов играет заметную роль при добыче ценных металлов из отходов промышленности как вторичного сырья. Преимуществом биотехнологий по сравнению с другими методами добычи являются относительная экономичность (отсутствие затрат на плавильные процессы) и отсутствие ущерба для окружающей среды. В настоящее время биовыщелачивание металлов успешно применяется для переработки сульфидных руд и концентратов, в которых сульфидные минералы являются субстратом для хемолитоавтотрофных бактерий и архей [1]. Извлечение ценных металлов из силикатных руд, силикатных твердых отходов и стекловидных шлаков до сих пор осуществляется физическими и химическими технологиями в связи с тем, что силикаты не могут служить достаточными субстратами, и разрушение силикатных минералов микроорганизмами требует дополнительного внесения органических соединений. В основном работы с применением «силикатных бактерий» (то есть бактерий, для которых показана способность разрушать силикатное сырье) в настоящее время находятся на уровне исследовательских разработок [2, 3], при этом было показано [4, 5], что результаты процессов бактериального выщелачивания силикатных материалов варьировали в зависимости от состава минералов и от применяемых штаммов.

Развитие работ в этом направлении в значительной степени связано с необходимостью извлечения ценных металлов из отходов электронной промышленности [6].

В настоящем сообщении представлены результаты наших лабораторных экспериментов по биовыщелачиванию минеральных материалов – стекловидных шлаков, образующихся при сжигании и переплавке отходов электронной промышленности с высоким содержанием ценных металлов и включающих диспергированные микроглобулы серебра и золота, остающихся после переплавки контактов. Шлаки были предоставлены компанией «Гвидон Голд» (Россия), занимающейся производством и добычей драгоценных металлов. В работе были использованы штаммы рода *Paenibacillus*, включая «силикатные бациллы» *P. edaphicus* и *P. mucilaginosus* [4]. В качестве основной среды культивирования использовали среду Белкановой [7].

В связи с технической сложностью определения высвобождения микроглобул металлического серебра и золота показателем деструкции шлаков служило легко анализируемое высвобождение железа и никеля. Эксперименты с выщелачиванием шлаков биомассой бактерий, продуцируемыми экзополисахаридами и растворенными метаболитами вместе и по отдельности позволили предположить, что основная биодеструкция силикатных материалов происходит при их взаимодействии с биогенными сахарами и / или экзополисахаридами. Это предположение согласуется с опубликованными данными химических исследований, в которых сахара могли играть роль катализатора деструкции полисиликатов [8]. Результаты наших экспериментов приведены в Таблице: они подтвердили возможность выщелачивания металлов из стекловидных шлаков бактериальными экзополисахаридами. В целом в ходе выполнения экспериментов была показана активная деструкция силикатных минеральных материалов штаммами *P. edaphicus* ВКМ В-2665^Т и *P. mucilaginosus* ВКПМ В-7519^Т, позволяющая рекомендовать эти штаммы для практического применения при переработке стекловидных шлаков.

Авторы благодарят сотрудников ИБФМ РАН А.Г. Быкова и В.Я. Лысанскую за помощь в проведении анализов.

Табл. Результаты выщелачивания стекловидных шлаков слизью (экзополисахаридами) бактерий рода *Paenibacillus*. Экспозиция – 3 суток.

Вариант	Содержание в растворе, мг/л	
	Ni ²⁺	Fe _{общ.}
Стерильный контроль	0,08	6,82
<i>P. mucilaginosus</i> ВКПМ В-7519	0,86	143,45
<i>P. edaphicus</i> ВКМ В-2665	0,78	134,82
<i>P. mucilaginosus</i> ВКМ В-1574	<0,05	4,00
<i>P. alvei</i> ВКМ В-502	<0,05	8,00
<i>P. polymyxa</i> ВКМ В-514	<0,05	8,00

Литература

1. Абашина Т.Н., Вайнштейн М.Б., Хаустов С.А. Бактериальная коррозия бетона и биовыщелачивание отходов горнорудной промышленности (Методическое руководство для микробиологических исследований) // Пушино: изд-во ТулГУ. 2015, 101 с.
2. Каравайко Г.И. Микробная деструкция силикатных минералов // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН: Юбилейный сборник к 70-летию института. М.: Наука. 2004. С. 172-196.

3. Вацурина А.В., Ким Е.А., Адамов Э.В., Крылова Л.Н., Вайнштейн М.Б. Биовыщелачивание силикатных никелевых руд // Тезисы докладов IV Съезда микробиологов Узбекистана, Ташкент, 9-10 октября 2008. С.24-25.
4. Sun D., Wan Q., Zhan X. Study on the conditions of silicon release by strain JXF of silicate bacteria // Mining Research and Development. 2008. V. 3. P. 34-37.
5. Zhan S., Liu J., Chen Y., Sun D. Single and cooperative bauxite bioleaching by silicate bacteria // IERI Procedia. 2013. V. 5. P. 172 – 177.
6. Kumar A., Saini H.S., Kumar S. Bioleaching of gold and silver from waste printed circuit boards by *Pseudomonas balearica* SAE1 isolated from an e-waste recycling facility // Current Microbiology. 2018. V. 75 (2). P. 194-201.
7. Белканова И.П., Ерощев-Шак В. А., Лебедева К. В., Каравайко Г.И. Растворение минералов кимберлита гетеротрофными микроорганизмами // Микробиология. 1987. Т. 56 (4). С. 15–29.
8. Lambert J.B., Gurusamy-Thangavelu S.A., Ma K. The silicate-mediated formose reaction: bottom-up synthesis of sugar silicates // Science. 2010. V. 327 (5968). P. 984-986

***Hansschlegelia quercus* sp. nov. - новый вид аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов**

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, nadyagafonova@gmail.com

Представители рода *Hansschlegelia* принадлежат семейству *Methylocystaceae* класса *Alphaproteobacteria*. В настоящее время род *Hansschlegelia* представлен тремя видами, при этом первый описанный вид – *H. plantiphila* S1^T – фитосимбионт, выделенный из почек сирени (*Syringa vulgaris* L.), два других: *H. zhihuaiae* S113^T и *H. beijingensis* PG04^T – изолированы из почв сельскохозяйственного назначения. Из почек дуба (*Quercus robur* L.), отобранных в окрестностях г. Пущино Московской области, на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии нами выделен ограниченно-факультативный метилотроф – штамм Dub, идентифицирован как новый вид рода *Hansschlegelia*.

Цель работы – характеристика нового аэробного метилотрофного изолята – штамма Dub.

Новый изолят представлен граммотрицательными короткими подвижными палочками, 0,5-0,7×1,0-1,2 мкм, имеет 2-5 жгутиков, капсул, спор и простек не образует, размножается бинарным делением, оптимально растет при температуре 19-22°C, pH 7,1-7,8 и до 1% NaCl в среде.

В жирнокислотном профиле преобладают C_{16:0}, C_{18:1ω7c} и C_{11-Me 18:1} кислоты, основной убихинон Q₁₀. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин. Энзимологический анализ показал, что штамм окисляет метанол классической метанолдегидрогеназой, обладает ферментами прямого окисления формальдегида и формиата, имеет высокие активности ключевых ферментов серинового пути – L-серин-глиоксилатаминотрансферазы и оксипируватредуктазы. Штамм Dub реализует изоцитратлиазоотрицательный вариант серинового пути C₁-метаболизма, так как активность изоцитратлиазы не вывлена. Интересно отметить, что у штамма Dub, в отличие от облигатных метилотрофов, обнаружена активность α-кетоглутаратдегидрогеназы, и помимо метанола он использует некоторые полиуглеродные соединения (ацетат Na, глутамат Na, сукцинат, фумарат, фруктозу, D-глюконовую кислоту, этанол) в качестве источников углерода и энергии.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК выявил, что штамм Dub наиболее сходен с представителями рода *Hansschlegelia*: 97,4% с *H. zhihuaiae* S113^T и 96,9% с *H. plantiphila* S1^T (рис. 1). Содержание Г+Ц в ДНК составило 66,9 мол. % (T_{пл}). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка MxaF показал, что штамм Dub имеет сходство с представителями рода *Methylopila*: 95-96% с *M. musalis* MUSA^T и *M. jiangsuensis* JZL-4^T, и лишь 88,8% с *H. plantiphila* S1^T.

Обнаружена способность штамма Dub синтезировать индолпроизводные (фитогормоны ауксины) (4-5 мкг/мл) при добавлении в среду предшественника – триптофана. В опытах по инокуляции клетками нового штамма стерильных семян салата (*Lactuca sativa* L.) и нестерильных семян мятлика лугового (газонная трава) (*Poa pratensis* L.) выявлено, что на 5 сутки роста высота стебля и масса колонизированных ростков превышала показатели контрольных (необработанных) в 1,5-2 раза (рис. 2).

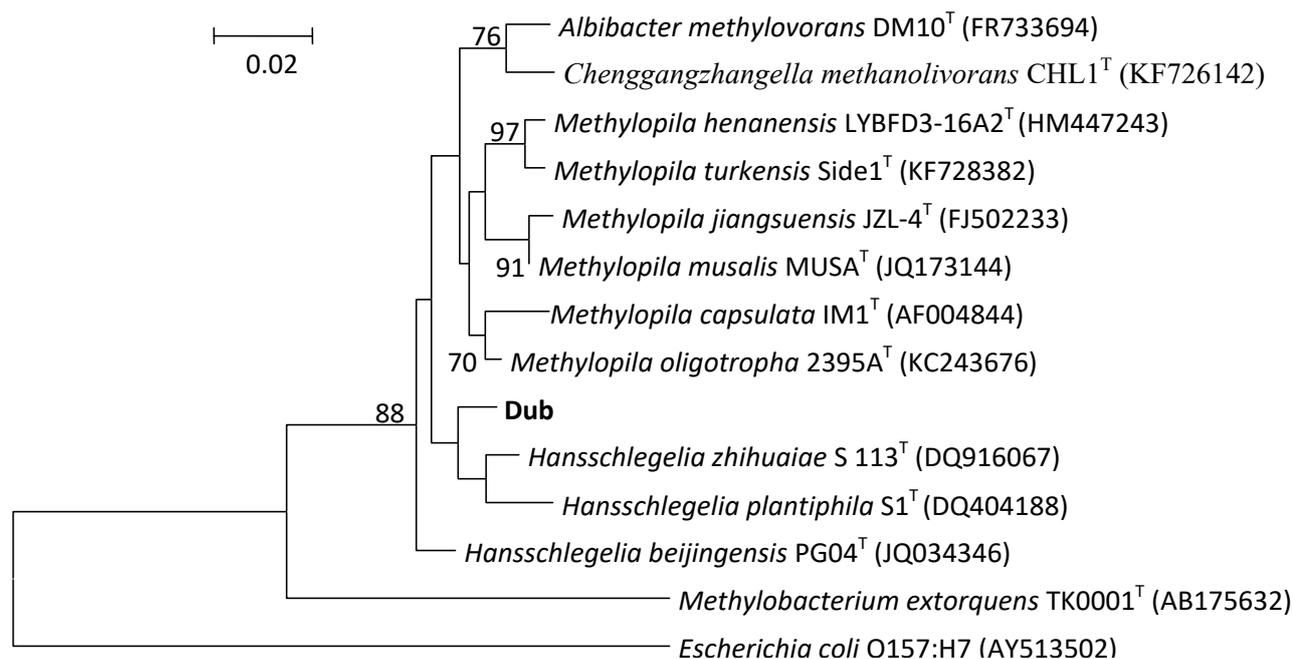


Рис. 1. Филограмма, показывающая положение штамма Dub на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, использован метод “*maximum-likelihood*”. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние).

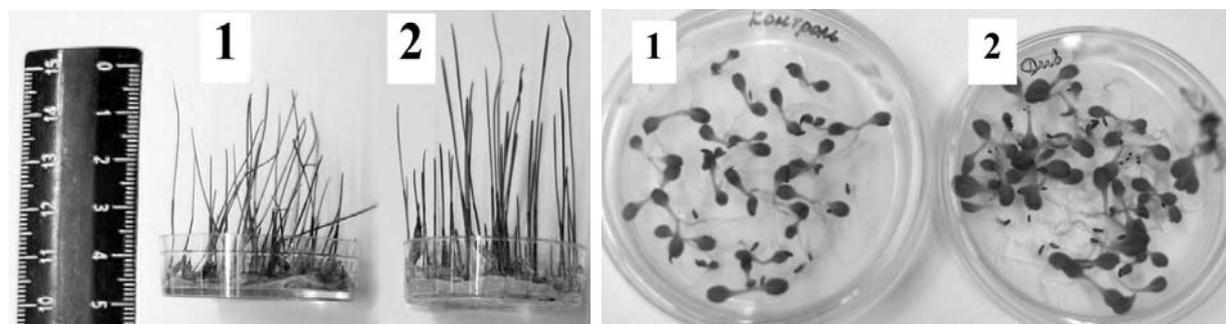


Рис. 2. Ростки мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) и салата (*Lactuca sativa* L.), контрольные (1) и колонизированные штаммом Dub (2).

Таким образом, методами полифазной таксономии штамм Dub идентифицирован как новый вид – *Hansschlegelia quercus* sp. nov., отличается от известных представителей рода

факультативных метилотрофов *Hansschlegelia* не только филогенетически, но и по морфологии и физиолого-биохимическим свойствам. Кроме того, показано, что новый метилотрофный изолят является фитосимбионтом, т.к. оказывает положительное влияние на рост растений.

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

Роль неорганических полифосфатов в устойчивости дрожжей к тяжелым металлам

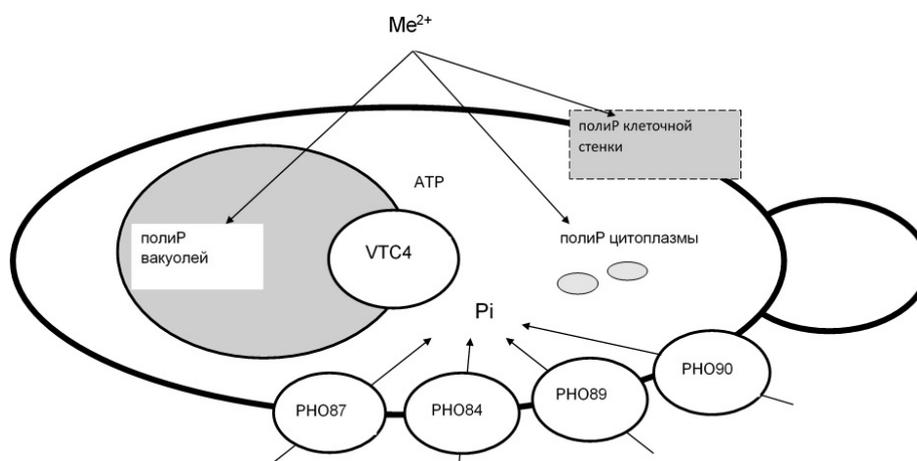
Андреева Н.А., Рязанова Л.П., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Ледова Л.А.,
Кулаковская Т.В.

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

Одним из инструментов, используемых микроорганизмами для адаптации к стрессам, вызванным токсическими концентрациями ионов тяжелых металлов в среде, являются неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, обладающие хорошей способностью к образованию комплексов с ионами металлов.

Виды дрожжей, относящиеся к разным таксономическим группам, различаются по способности преодолевать такой вид стресса. Например, *Cryptococcus humicola* устойчив к Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} при концентрации 2,5 мМ, а рост *Cryptococcus terreus* и *Rhodotorula bogoriensis* полностью подавляется при этой концентрации указанных ионов. Более устойчивые виды накапливают больше полиР при этом воздействии, за исключением *Cryptococcus terricola*. Клетки этого вида не накапливают полиР в ответ на стресс, вызванный избытком марганца, однако отмечено увеличение содержания этих полимеров в клеточной стенке, оцениваемое с помощью окраски специфическим флуорохромом ДАПИ.

Адаптация *Saccharomyces cerevisiae* к токсической концентрации ионов Mn^{2+} (4 мМ) после необычно продолжительной лаг-фазы (до 4 суток), сопровождается накоплением полиР и увеличением длины цепи кислоторастворимых полиР. Это объясняется увеличением экспрессии генов, кодирующих транспортеры фосфата Pho84, Pho87, Pho89 и Pho90 и снижением экспрессии генов, кодирующих полифосфатазы. Штаммы-суперпродуценты полифосфатаз более чувствительны к ионам кадмия, чем исходные штаммы, использованные для трансформации. Штаммы с нарушением функционирования вакуолей характеризуются повышенной чувствительностью к ионам тяжелых металлов. Это связано как с нарушением компартментации тяжелых металлов в вакуолях, так и со сниженным уровнем полиР в клетках этих штаммов.



В целом, роль полиР в детоксикации ионов тяжелых металлов у дрожжей может быть описана следующим образом:

- избыток ионов тяжелых металлов в среде является сигналом к увеличению экспрессии транспортеров фосфата;
- клетки поглощают больше фосфата;
- в результате увеличивается накопление полиР в клеточной стенке, вакуолях и цитоплазматических включениях;
- полиР образуют комплексы с тяжелыми металлами, обеспечивая их детоксикацию.

Характеристика ризосферных бактерий, выделенных из нефтезагрязненной почвы Нефтеюганского района

Анохина Т. О., Сазонова О. И., Соколов С. Л., Сизова О. И., Сиунова Т. В., Кочетков В. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино,
to_anohina@rambler.ru

Бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, принято обозначать как PGPR (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, стимулирующие рост растений). Среди PGPR особо выделяются микроорганизмы рода *Pseudomonas*, которые являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биопрепаратов как для защиты растений от фитопатогенов, так и для повышения продуктивности растений. Ризосферные псевдомонады могут стимулировать рост и развитие растений либо напрямую, за счет синтеза различных полезных метаболитов, либо опосредованно, за счет подавления или вытеснения фитопатогенов. К прямой стимуляции роста растений относятся: продукция фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов и пр.), снижение уровня этилена за счет активности фермента 1-аминоциклопропан 1-карбоксилат деаминазы (АЦКД), фиксация атмосферного азота (благодаря наличию нитрогеназного комплекса), улучшение фосфорного питания (за счет экспрессии фосфатаз, фосфолипаз и др.). Антагонистическая роль почвенных бактерий в отношении фитопатогенов растений, лежащая в основе опосредованной стимуляции роста растений, реализуется за счет синтеза ризобактериями сидерофоров, антибиотиков, продукции цианида водорода и других соединений. Воздействие экстремальных факторов, таких как загрязнение почвы органическими поллютантами, тяжелыми металлами, засоленность, изменение кислотности почвы, низкая температура, приводит к стрессу ризосферных бактерий, что может понижать или нивелировать их положительное воздействие на растения. Микроорганизмы, обладающие устойчивостью к стрессовым условиям среды, также представляют особый интерес при разработке биопрепаратов для фиторемедиации.

Целью работы было выделение из нефтезагрязненных сайтов ризосферных бактерий, подавляющих широкий круг фитопатогенов, и характеристика их PGPR свойств.

Из ризосферы дикорастущих растений, отобранных на нефтезагрязненной территории Нефтеюганского района было отобрано 18 штаммов, способных подавлять фитопатогенные грибы и бактерии. На основании секвенирования гена 16S рРНК 15 штаммов были отнесены к различным видам бактерий рода *Pseudomonas*, один – к *Brevundimonas bullata*, два – к *Serratia plymuthica* и *S. fonticola*. Штаммы *P. protegens* 14, 32, 45 и *Pseudomonas* sp. 21 проявили себя как наиболее активные антагонисты в отношении как фитопатогенных грибов (*Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (штамм Ggt 1818), *Fusarium graminearum*), так и бактерий (*Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*). Для выявления антибиотически активных метаболитов у выделенных ризосферных штаммов была проведена тонкослойная хроматография (ТСХ)

экстрактов культуральной жидкости. У девяти штаммов: *P. brenneri* 47 *P. protegens* 14, 32, 45, *Pseudomonas* sp. 21, *P. veronii* 27, 43, *P. fluorescens* 29, *P. yamanorum* 48 обнаружен профиль соединений, сходный с профилем известного штамма *P. protegens* Pf-5, продуцирующего 2,4-диацетилфлороглюцин, пиолотеорин и пирролнитрин. У *P. fluorescens* 24 в УФ наблюдалось пятно, сходное по флуоресценции и по коэффициенту подвижности с феназин-1-карбоновой кислотой. Штаммы *P. brenneri* 11 и *P. yamanorum* 42 проявляли умеренную антагонистическую активность, но на ТСХ у них не было выявлено мажорных пятен. Возможно, их воздействие на фитопатогены связано с продукцией других метаболитов. Только у одного штамма *Pseudomonas* sp. 21 обнаружена способность продуцировать цианид водорода, который также участвует в подавлении фитопатогенов.

Помимо антагонистической активности выделенные ризосферные штаммы обладали дополнительными свойствами, характерными для бактерий группы PGPR. Восемь штаммов: *P. protegens* 14, 32 и 45, *Pseudomonas* sp. 21, *P. fluorescens* 29, *P. yamanorum* 42, *P. brenneri* 47 и *S. fonticola* 33 наиболее активно растворяли гидроксипатит кальция, содержащегося в минеральной среде в качестве единственного источника фосфора. Все отобранные штаммы росли в широком диапазоне температуры от 6 до 37°C, за исключением *P. putida* 49. На рост штаммов не влияла низкая кислотность среды (pH 5) или повышенная концентрация хлористого натрия (3–5%). Не смотря на то, что ризосферные штаммы были выделены из почв, загрязненных нефтью, подавляющее число не было способно к росту на углеводородах нефти и продуктах ее переработки: было обнаружено только два штамма-деструктора: *P. veronii* 43 утилизировал нафталин, а *P. putida* 49 – нафталин, салицилат и гентизат.

Отобранные штаммы тестировали методом ПЦР на наличие известных последовательностей генов биосинтеза соединений, прямо или опосредованно стимулирующих рост и развитие растений. У штамма *Serratia plymuthica* 19 показано наличие гена *ipdC*, являющегося ключевым в индолил-3-пируватном пути биосинтеза ауксина – индолил 3-уксусной кислоты (ИУК). Последовательность гена *iaaH*, кодирующего ключевой фермент индолил-3-ацетамидного пути биосинтеза ИУК, не была обнаружена ни у одного исследованного штамма. У штамма *P. fluorescens* 24 показано наличие гена 1-аминоциклопропан 1-карбоксилат деаминазы, *acdS*. У 15 исследуемых штаммов псевдомонад получен положительный ответ на ген экзополифосфатазы *Ppx/GppA*, участвующей в метаболизме полифосфатов и обеспечивающей доступность фосфора для растений. У четырех штаммов (*Pseudomonas* sp. 21, *P. protegens* 14, 32 и 45) выявлена последовательность гена *phlD*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза антибиотика 2,4-диацетилфлороглюцина – поликетидсинтазу. У штамма *P. fluorescens* 24 присутствует фрагмент феназинового оперона *phzCD*, ответственный за биосинтез антибиотика феназин-1-карбоновой кислоты. Ни в одном из исследуемых штаммов не было обнаружено последовательностей генов биосинтеза гибберелловой кислоты, нитрогеназы и таких антибиотиков, как пиолотеорин и пирролнитрин.

В микроvegetационных экспериментах штаммы *P. fluorescens* 24, *P. veronii* 27, 40 и 43, *P. yamanorum* 42 и *P. brenneri* 47 показали способность стимулировать рост растений пшеницы. При этом штаммы *P. veronii* 27 и *P. brenneri* 47 по показателям средней сырой массы корней и побегов превосходили контрольный PGPR штамм *P. protegens* 38а.

Выделенные нами ризосферные штаммы обладают совокупностью полезных для растений свойств и устойчивы к стрессовым факторам окружающей среды. Новые штаммы могут являться основой биопрепаратов для улучшения роста растений, выращиваемых в холодном климате, а также для фиторемедиации нефтезагрязненных почв.

Метаболизм нафталина у таксономически удаленных штаммов-деструкторов *Rhodococcus* sp. O539F и *Pseudomonas chlororaphis* OV17(pOV17)

Анохина Т.О., Есикова Т.З., Соляникова И.П.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
г. Пущино, to_anohina@rambler.ru

Биохимические пути и генетические системы биodeградации нафталина наиболее полно изучены у бактерий рода *Pseudomonas*. Гены катаболизма нафталина могут иметь как хромосомную локализацию, так и находиться на конъюгативных плазмидах. Метаболизм нафталина у грамположительных бактерий, в частности, у представителей рода *Rhodococcus* изучен в меньшей степени. Тем не менее, эти бактерии обладают широким биodeградативным потенциалом и способны утилизировать токсичные органические вещества, такие как ароматические углеводороды и хлорсодержащие соединения.

Целью работы было изучение метаболизма нафталина у штамма-деструктора *Rhodococcus* sp. O539F в сравнении с *Pseudomonas chlororaphis* OV17(pOV17) и выявление биохимических особенностей этого процесса.

Объектами исследования служили штаммы-деструкторы нафталина: ризосферный плазмидосодержащий штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17) (Anokhina et al., 2006) и *Rhodococcus* sp. O539F, выделенный из очистных сооружений г. Пущино прямым высевом на минеральную среду М9 с добавлением нафталина в качестве единственного источника углерода и энергии. Изучение биodeградативного потенциала штамма O539F показало, что, помимо нафталина, эта бактерия способна к росту на некоторых ароматических соединениях (фтатат, фенол, толуол, гентизат, протокатехоат) и *n*-алканах (алканы с четным числом атомов углерода: октан, гексадекан; алканы с нечетным числом атомов углерода: гептан, ундекан).

Характерной особенностью штамма *Rhodococcus* sp. O539F, в отличие от *P. chlororaphis* OV17(pOV17), является его неспособность утилизировать салицилат – ключевой интермедиат биodeградации нафталина и других полициклических ароматических углеводородов. Рост штамма отсутствовал на минеральной среде, содержащей различные количества субстрата – 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0 г/л. Отсутствие роста у *Rhodococcus* sp. O539F на салицилате может указывать на наличие неполного пути окисления нафталина. Альтернативно, утилизация нафталина у данного штамма происходит по другому биохимическому пути.

Для изучения пути окисления нафталина у *Rhodococcus* sp. O539F были определены удельные активности ключевых ферментов метаболизма этого соединения (табл.).

Табл. Удельная активность ферментов биodeградации нафталина у штаммов *Rhodococcus* sp. O539F и *P. chlororaphis* OV17(pOV17)

Штамм	Ростовой субстрат	Удельная активность (мкмоль/(мин × мг белка))				
		СГ	ПК-1,2-ДО	ПК-2,3-ДО	ГДО	ПКК-ДО
O539F	Нафталин	0	0.0108	0.0343	0	0
O539F	Сукцинат	0	0.0263	0.0019	0	0
OV17(pOV17)	Салицилат	0.3101	0.0351	0.1109	0	0
OV17(pOV17)	Глутамат	0.0114	0.0183	0.2837	н.о.	н.о.

СГ – салицилат гидроксилаза, ПК-1,2-ДО – пирокатехин 1,2-диоксигеназа, ПК-2,3-ДО – пирокатехин 2,3-диоксигеназа, ГДО – гентизат 1,2-диоксигеназа, ПКК-ДО – протокатехоат диоксигеназа

Известно, что «классический» путь окисления нафталина включает образование салицилата в качестве ключевого интермедиата. Далее салицилат окисляется до гентизата или пирокатехина. В процессе последующей деструкции гентизат расщепляется под

действием гентизат 1,2-диоксигеназы, а пирокатехин расщепляется или в положении 1,2 или 2,3 диоксигеназами: пирокатехин 1,2-диоксигеназой (ПК-1,2-ДО) или пирокатехин 2,3-диоксигеназой, метапирокатехазой (ПК-2,3-ДО = МПК-ДО), соответственно. Было установлено, что у изучаемого нами родококка полностью отсутствует активность салицилат гидроксилазы. Также не промерялась активность гентизат 1,2-диоксигеназы. Таким образом, было получено свидетельство, что у *Rhodococcus* sp. O539F функционирует другой, не классический путь окисления нафталина. Также возможно, что окисление нафталина было неполным. Интересным является также тот факт, что в штамме *Rhodococcus* sp. O539F, выращенном на нафталине, присутствуют активности ферментов, окисляющих пирокатехин – пирокатехин 1,2-диоксигеназы и пирокатехин 2,3-диоксигеназы, причем синтез ПК-1,2-ДО является конститутивным (активность также фиксируется при выращивании на сукцинате). Поскольку исследуемый штамм не способен к росту на салицилате и не имеет активности салицилат гидроксилазы, наличие активностей ПК-1,2-ДО и ПК-2,3-ДО остается необъясненным.

Из-за отсутствия в коллекции штамма родококка, обладающего фенотипом Nah^+Sal^+ , в качестве контроля был использован штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17), утилизирующий нафталин и салицилат (Anokhina et al., 2006). У *P. chlororaphis* OV17(pOV17) при росте на нафталине были определены активности салицилат гидроксилазы и обеих ПК-ДО. При этом активность метапирокатехазы была на порядок выше активности пирокатехин 1,2-диоксигеназы (табл.). Это означает, что штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17) разлагает нафталин по «классическому», хорошо описанному в литературе пути.

Исследование особенностей окисления нафталина родококком показало, что он реализует путь, отличный от пути деструкции нафталина псевдомонадой. Ранее был описан штамм *R. opacus* M213, у которого деградация нафталина осуществляется через образование производных коричной кислоты, кумарина и орто-фталевой кислоты (Pathak et al., 2016). Поскольку штамм *Rhodococcus* sp. O539F способен к утилизации фталата, предположительно, фталат может являться интермедиатом деструкции нафталина и данным штаммом. Таким образом, стратегия метаболизма одних и тех же соединений у таксономически удаленных бактерий может быть различной. Установление пути разложения нафталина родококками требует детального изучения.

Литература

1. Anokhina T.O., Volkova O.V., Puntus I.F., Filonov A.E., Kochetkov V.V., Boronin A.M. Plant growth-promoting *Pseudomonas* bearing catabolic plasmids: naphthalene degradation and effect on plants. *Process Biochemistry*. 2006. V. 41. No. 12. P. 2417–2423.
2. Pathak A., Chauhan A., Blom J., Indest K.J., Jung C.M., Stothard P., Bera G., Green S.J., Ogram A. Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* strain M213 particularly for naphthalene degradation. *PLOS ONE*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0161032.

Вторичные метаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных экосистем высоких широт

**Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А.,
Иванушкина Н.Е., Озерская С.М., Козловский А.Г.**

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

Экосистемы высоких широт рассматриваются как местообитания с экстремальными экологическим факторами, где низшие эукариотические организмы, адаптированы к

жестким условиям существования. Анализ грибного разнообразия в большом числе образцов многолетнемерзлых грунтов, криопегов, палеосемян, хранившихся в мерзлых грунтах, позволяет выявить повторяющиеся таксоны, имеющие высокую частоту встречаемости в холодных местообитаниях. К ним относятся виды грибов рода *Penicillium* [1, 2].

Ранее проведенные исследования показали, что различные виды грибов рода *Penicillium*, выделенные из регионов многолетней мерзлоты, продуцируют разнообразные вторичные метаболиты, многие из которых являются микотоксинами [3]. Кроме того, использование макро и микроморфологических признаков в сочетании с профилями экзометаболитов позволяет уточнить видовую принадлежность исследованных штаммов в соответствии с новейшими таксономическими схемами данной группы грибов.

Цель работы было изучение спектра экзометаболитов у грибов рода *Penicillium*, выделенных в экосистемах высоких широт, и уточнение их таксономического положения.

Проведен анализ вторичных метаболитов у 25 штаммов пенициллов, выделенных в экосистемах высоких широт: из верхнего слоя антарктических отложений и многолетнемерзлых отложений Арктики [4]. Было установлено, что 80% исследованных штаммов продуцировали вторичные метаболиты, которые относились к бензодиазепиновым алкалоидам (анацин, циклопенин, циклопептин), виридикатиновым алкалоидам (виридикатин, 3-метоксивиридикатин), дикетопиперазиновым алкалоидам (аурантиамин, 3,12-дигидророкефортин, рокефортин, ругулозувин Б), индольным алкалоидам (коммунезин Б, хаэтоглобозин А), клавиновым эргоалкалоидам (ругуловазины А и Б, фестуклавин, фумигаклавины А и Б, циклопиазоновая кислота, поликетидам (микофеноловая кислота, цитреовиридин), терпенам (андрастины А и С, фоменон) и N-ацетилтриптамин.

На основании культурально-морфологических признаков и хемотаксономических маркеров (профилей вторичных метаболитов) исследованные штаммы были отнесены к видам *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. dierckxii*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. palitans*, *P. polonicum*, *P. restrictum*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *P. variable*. Эти виды относятся к космополитам и психротолерантным видам, встречаются ксеротолерантные организмы, что естественно для аридных условий Антарктиды и Арктики. Благодаря психротолерантности и ксеротолерантности они имеют более высокую скорость роста при пониженных температурах, чем другие виды. Многим грибам, адаптированным к низким температурам, свойственно менять культурально-морфологические признаки.

У штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из антропогенно нарушенных верхних слоев антарктических отложений и подповерхностных арктических грунтов наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению со штаммами, выделенными из древних многолетнемерзлых отложений. Есть не единичные подтверждения тому, что активация синтеза экзометаболитов может происходить как реакция на окислительный стресс [5], что подтверждает предположение, что образование вторичных метаболитов дает грибам продуцентам преимущество для выживания в экстремальных эконишах. В данном исследовании впервые обнаружено образование андрастинов штаммом вида *P. restrictum*. Показано широкое распространение ругуловазинов у вида *P. variable*.

Литература

- [1] Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. // Life in Ancient ice / Eds. J. Cactello, S. Rogers. Proceed. Prins. Univ. Princeton: Princeton Univ. Press, 2005. Ch. 9. P. 127–139.
- [2] Кочкина Г.А., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Чигинева Н.И., Василенко О.В., Спирина Е.В., Гиличинский Д.А. // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 236-244.

- [3] Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V. // *Permafrost: Distribution, Composition, and Impact on Infrastructure and Ecosystems* / Ed. O.S. Pokrovsky. New York: Nova Science Publishers, 2014. P. 265-280.
- [4] Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М., Козловский А.Г. // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 5. С. 519-529.
- [5] Hong S.Y., Roze L.V., Linz J.E. // *Toxins (Basel)*. 2013. V. 5. P. 683–702.

Образование новых клеточных ультраструктур в стрессовом ответе дрожжей *Yarrowia lipolytica*

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, aarin@rambler.ru

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов внешней среды (стрессоров). Способность к существованию в экстремальных условиях связана с высокими адаптационными возможностями клеток микроорганизмов, «запускающими» механизмы, обеспечивающие им выживание и конкурентоспособность в различных стрессовых условиях, в том числе при действии оксидантов, этанола или температуры. Действие защитных механизмов включает синтез защитных или сигнальных метаболитов, ферментов.

Объектом данного исследования были выбраны дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые являются продуцентами многих практически ценных соединений (органических кислот, липаз, цитохрома *c*, L-lactate oxidase и др.).

Ранее при изучении адаптивного ответа *Y. lipolytica* на стрессовые воздействия было показано изменение физиологических параметров клетки, таких как выживаемость, дыхательная активность, активность антиоксидантных систем (включая альтернативную оксидазу), тем или иным путем участвующих в удалении АФК [1].

Наряду с изменениями энергетического и антиоксидантного статусов клетки естественно ожидать изменений в ультраструктурной организации клетки.

В настоящем сообщении показано, что стресс-реакции проявляются не только как изменение различных ферментативных активностей и их соотношений. Адаптация к

различным стрессовым воздействиям включает также дополнительные «специализированные» реакции, такие как реструктуризация и появление новых клеточных ультраструктур.

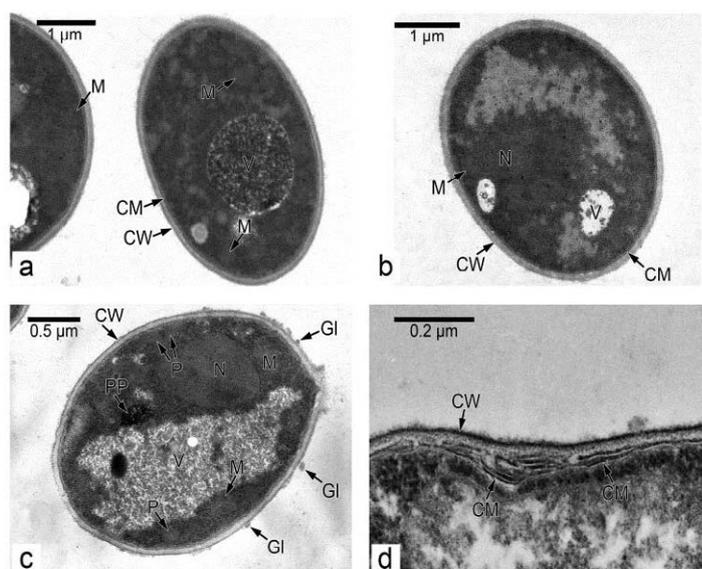


Рис. 1. Ультратонкие срезы клеток *Y. lipolytica*

а - экспоненциальная фаза роста на глюкозе (контроль); б - стационарная фаза роста; с, d - условия окислительного стресса. Длина масштабной метки 1 мкм. N - ядро, CW - клеточная стенка, CM - цитоплазматическая мембрана, M - митохондрия, P - пероксисома, V - вакуоль, Gl - глобулярные структуры, PP - полифосфаты.

С помощью электронно-микроскопических исследований показано, что в стрессовых условиях (окислительный, тепловой или холодовой стресс), на поверхности клеточной стенки отмечалось появление множества глобулярных структур неизвестной природы (рис. 1с).

Обнаружено также, что в условиях окислительного или температурного стрессов в клеточной стенке происходит формирование так называемых каналцев - локальных электронно-прозрачных зон с разрыхленной структурой в форме (на рис. не показано).

Была проведена цитохимическая реакция на перекись разлагающие активности и было обнаружено образование отчетливо выраженных мембранных везикул (рис. 2). В исследованиях на живых клетках (без предварительной фиксации глутаровым альдегидом) было показано, что продукт реакции окислительной полимеризации 3,3' - диаминобензидина выявляется в дискретных зонах по всей толщине оболочки клеток, а также на ее поверхности. Образующиеся в стрессовых условиях мембранные везикулы, вероятно, «выбрасываются» в межклеточное пространство. В данном случае удалось их зафиксировать только благодаря тому, что они удерживаются вблизи поверхности клетки продуктом окислительной полимеризации - диаминобензидином. При обычной фиксации они теряются при препарировании.

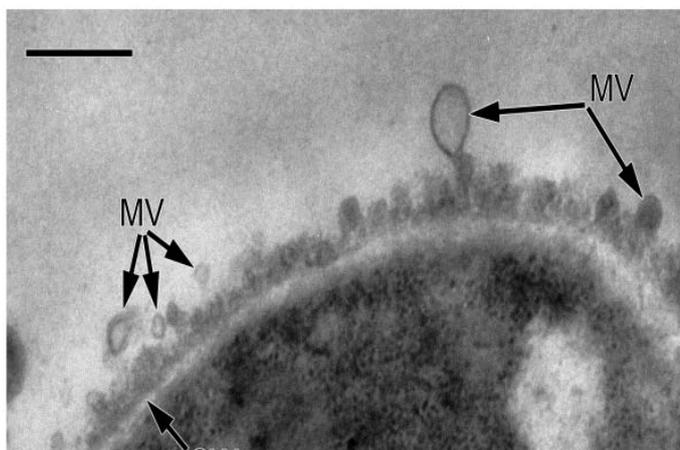


Рис. 2. Фрагмент неокрашенного ультратонкого среза клеток *Y. lipolytica* (окислительный стресс). MV – мембранные везикулы, сформировавшиеся в результате цитохимической реакции окислительной полимеризации 3,3' - диаминобензидина. Масштабная метка 0.3 мкм.

В связи с этим возникает вопрос о структурной реорганизации и целостности цитоплазматической мембраны (плазмалеммы). Как видно на ультратонких срезах клеток из экспоненциальной или стационарной фазы роста на глюкозе (контрольные варианты) (рис. 1а, b), плазмалемма характеризуется трехслойной структурой (два электронно-плотных и один электронно-прозрачный слой). В условиях стресса у адаптированных клеток была обнаружена многослойная плазмалемма (рис. 1d), что возможно, указывает на фазу активной реструктуризации клеток, как это было показано для некоторых бактерий в лаг-фазе роста [2].

Образование многослойной мембраны, а также мембранных везикул, предположительно, может быть связано со сверхсинтезом мембранных фосфолипидов в стрессовых условиях.

Образование новых ультраструктур в стрессовых условиях были отмечены и в других компартментах клетки. Ранее было показано [3], что действия стрессоров приводят к образованию в цитозоле электронно-плотных включений полифосфатов (рис. 1с), отсутствующих в контроле (рис. 1 а, b). Присутствие фосфора в образовавшихся гранулах было определено с помощью рентгеноструктурного анализа элементного состава.

Все указанные выше структурные модификации клеточной оболочки и образование новых структур наблюдались только в стрессовых условиях и не были обнаружены ранее у дрожжей *Y. lipolytica*. Это лишнее раз демонстрирует, что в стрессовых условиях микроорганизмы проявляют свойства, не известные для них ранее.

Литература

1. А.Ю. Аринбасарова, Е.Н. Бирюкова, А.Г. Меденцев. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Прикл. Биохим. и микроб. 2015. т. 51, с. 122-131.
2. Duda, V.I., Suzina, N.E., Severina et al. 2001. Formation of flat lamellar intramembrane lipid structures in microorganisms // J. Membr. Biol. 180(1): 33–48.
3. Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю. «Изменение ультраструктуры дрожжей *Yarrowia lipolytica* в стрессовых условиях» // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 344-348.

Аурофузарин – внутриклеточный димерный нафтохинон гриба *Fusarium decemcellulare*

Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, aarin@rambler.ru

Грибы рода *Fusarium* синтезируют более 30 нафтохиноновых метаболитов. Нафтохиноны проявляют широкий спектр биологической активности и проявляют антимикробное [4], инсектицидное [4], антипаразитарное [2, 5], фитотоксическое [2, 6, 7] а также противоопухолевое [8] действие.

Из культуральной жидкости гриба *Fusarium decemcellulare* ВКМ F- 1179 был выделен внутриклеточный желтый пигмент, идентифицированный как димерный нафтохинон аурофузарин.

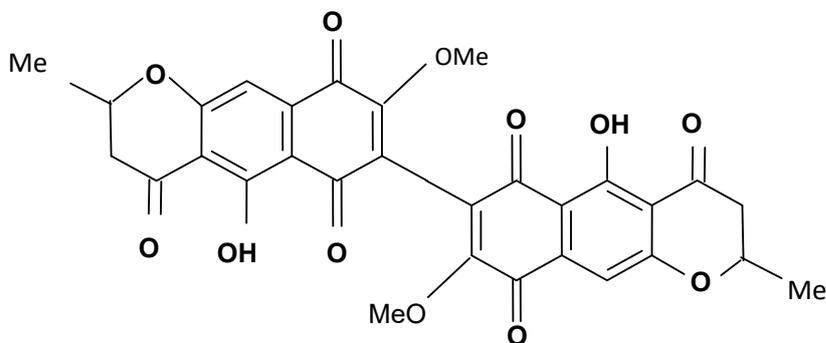


Рис. 1. Структурная формула аурофузарина

Метаболит экстрагировали из мицелия хлороформом после обезвоживания абсолютным этанолом. Очищали пигмент с помощью препаративной хроматографии на пластинках Si-60 («Мегск») с 1 мм силикагеля (20 x 20 см) в системе хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота (96 : 2 : 2, v : v : v). Кристаллизацию пигмента осуществляли из хлороформа путем осаждения этилацетатом. Были получены желто-золотистые кристаллы, Т пл. 350 °С; R_f 0,21.

Табл. 1. Спектральные характеристики пигмента из гриба *Fusarium decemcellulare* ВКМ F- 1179

Спектры ¹ H-ЯМР (δ , м.д. относительно ТМС)	Основные интенсивные пики в масс-спектре, m/z, %	ИК-спектр $\nu_{\text{макс}}$, см ⁻¹ таблетки КВг	Спектр поглощения в УФ и видимой областях, $\lambda_{\text{макс}}$, нм этанол
2,44-CH ₃	570(26)	1667(CO)	243
4,10-O CH ₃	555(56)	1662(CO)	268
6,22 - H	540(45)	1612(CO)	378
7,60 -H	525(100)	1497	
14,13 -ОН	511(10)		

Сравнение полученных нами результатов с литературными данными [9] позволило идентифицировать выделенный из гриба пигмент как димерный нафтохинон аурофузарин (рис.1).

В зависимости от условий культивирования гриб синтезирует различные нафтохиноновые метаболиты, различающиеся по структуре и локализации в клетке. (табл. 2).

Табл. 2. Синтез нафтохиноновых пигментов грибом *Fusarium decemcellulare* в различных условиях культивирования

Условия культивирования	Нафтохиноны
pH \leq 4,0	Растворимые внеклеточные – фузарубин, яваницин, новарубин, норяваницин, ангидрофузарубин
pH \geq 8,0	Аурофузарин (внутриклеточный пигмент)
Лимит по азоту (pH 5,5-7,0)	Аурофузарин
Лимит по фосфору (pH 5,5-7,0)	Аурофузарин
Ингибирование дыхания (антимидин А), pH 5,5-7,0.	Аурофузарин

Показано, что аурофузарин проявлял антимикробную активность - подавлял рост бактерий и грибов: *Pseudomonas putida* ВКМ В-1301, *P. aerofaciens* ВКМ В-901, *Staphylococcus aureus* ВКМ В-1230, *Arthrobacter globiformis* ВКМ В-658, *Yarrowia lipolytica* ВКМ У-2378, *Torulopsis candida* ВКМ У-1155, *Penicillium rubrum* ВКМ F-345. Полное подавление роста (на 100%) наблюдалось в диапазоне сравнительно низких концентраций (1-50 мкг/мл).

Литература

1. Thomson R.H. // Naturally Occurring Quinones. London: Acad. Press, 1971. P. 198-336.
2. Medentsev A.G., Akimenko V.K. // Phytochemistry. 1998. V. 47. № 6. P. 935-959.
3. Parisot D., Devys M., Barbier M. // Microbios. 1990. V. 64. № 1. P. 31-47.
4. Tanaka H., Koyama Y., Awaya J., Marumo H., Oiwa R., Katagiri M., Nagai T., Omura S. // J. Antibiotics. 1975. V. 28. № 8. P. 860-867.
5. Tanaka H., Marumo H., Nagai T., Okada M., Taniguchi K., Omura S. J. // Antibiotics. 1975. V. 28. № 9. P. 925-930.
6. Nemeš S., Baker R.A., Tatum J.H. // Soil Biol. Biochem. 1988. V. 20. № 4. P. 493-499.
7. Albrecht A., Heiser I. // J. Plant Physiol. 1998. V. 153. № 2. P. 462-468.
8. Claydon N., Grove J.F., Pople M. // J. invert. Pathology. 1977. V. 30. № 2. P. 216-223.
9. Shibata S., Morishita E., Takeda T., Sakata K. Metabolic Products of fungi. XXVIII. Structure of aurofusarubin. Chem.Pharm. Bull. 1968, V.16 (3), P 405-410.

Дыхательные редуктазы *Dnitrovibrio Acetiphilus*

¹Архипова О.В., Абашина Т.Н., Хохлова Г.В., ²Микулинская Г.В.

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, aroksan@gmail.com

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино

Denitrovibrio acetiphilus DSM 12809 (класс *Deferribacteres*), способный к анаэробному дыханию путем сочетания окисления ацетата и восстановления нитрата, был выделен в чистую культуру на рубеже тысячелетий (Sanford et al., 2002; Myhr, Torsvik, 2000). В секвенированном геноме *D. acetiphilus* были обнаружены наиболее близкие гомологи генов метакрилатвосстанавливающей системы *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*; Arkhipova et al., 2015). Метакрилат (2-метилпропеноат) – соединение органическое, ненасыщенное, неприродное, токсичное, присутствует в отходах метакрилатных производств. Использование метакрилата в качестве терминального акцептора электронов – уникальное свойство анаэробной ацетатоокисляющей грамотрицательной бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 (Галушко и др., 1994). Периплазматический ферментный комплекс, восстанавливающий метакрилат, состоит из двух хромопротеидов: флавиносодержащей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и её физиологического донора электронов – тетрагемового цитохрома *c* Mcc (30 кДа) (Mikoulińska et al., 1999). Было показано, что продукты генов-гомологов *mrd* и *mcc* *D. acetiphilus*, как и Mrd и Mcc *G. sulfurreducens* AM-1, имеют консервативные участки и синтезируются с отщепляемыми сигнальными последовательностями (Arkhipova et al., 2015), обеспечивающими периплазматическую локализацию обоих белков.

Целью работы был поиск метакрилатредуктазной активности у анаэробной бактерии *D. acetiphilus* - обладателя генов-гомологов компонентов метакрилатной редокс системы и, в случае обнаружения, определение её внутриклеточной локализации. Для достижения поставленной цели необходимо было исключить, что восстановление метакрилата является побочной активностью другой редуктазы. В связи с этим были протестированы активности дыхательных редуктаз, восстанавливающих акрилат (природный аналог метакрилата), а также фумарат и нитрат, используемый в качестве субстрата-акцептора для роста *D. acetiphilus*.

Активности метакрилатредуктазы, акрилатредуктазы, фумаратредуктазы и нитратредуктазы были измерены в суспензиях целых клеток *D. acetiphilus*. Все ферментативные активности определяли в двух вариантах: в присутствии пермебилизирующего внутренние мембраны детергента ЦТАБ (бромид цетилтриметиламмония) и без него. Клетки *D. acetiphilus* оказались способны восстанавливать нитрат, фумарат и метакрилат, причем добавление ЦТАБ снижало скорость восстановления метакрилата, но значительно увеличивало таковую фумарата. Скорость восстановления нитрата оставалась приблизительно одинаковой в присутствии и отсутствии ЦТАБ. По-видимому, нитратредуктазная активность *D. acetiphilus* свойственна двум разным ферментным системам: одна из них локализована в периплазме, другая – внутри клетки. Фумаратредуктазная активность, очевидно, внутриклеточная. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *D. acetiphilus* обладает метакрилатвосстанавливающей активностью, локализованной, по всей видимости, в периплазме и не интерферирующей с другими редуктазными активностями.

Эксперименты, основанные на разделении периплазматической и внутриклеточной фракций *D. acetiphilus*, подтвердили наличие метакрилат- и нитратвосстанавливающих активностей в периплазме, а фумарат- и нитратвосстанавливающих активностей – внутри

клетки. Метаакрилатредуктазная активность в гомогенате «отмытых клеток» *D. acetiphilus* не была обнаружена.

Для того, чтобы соотнести выявленные редуктазные активности с конкретными белками, мы проанализировали геном *D. acetiphilus* DSM 12809. Гомологи Mrd и Mss *D. acetiphilus*, по всей видимости, являются компонентами единой редокс системы, поскольку их гены также организованы в одну транскрипционную единицу, как и у *G. sulfurreducens* AM-1 (Arkhipova et al., 2015). Гипотетический белок-гомолог Mrd WP_013011784.1 (бывший YP_003505239.1) *D. acetiphilus* имеет молекулярную массу зрелого белка около 51 кДа и отщепляемый сигнальный пептид типа Tat, как и метаакрилатредуктаза из *G. sulfurreducens* AM-1. Гипотетический цитохром *c*-гомолог Mss WP_013011783.1 (бывший YP_003505238.1) из *D. acetiphilus* имеет молекулярную массу зрелого белка около 26 кДа и отщепляемый сигнальный пептид типа Sec, подобно Mss из *G. sulfurreducens* AM-1. Наличие у незрелых гомологов Mrd и Mss отщепляемых сигнальных пептидов типов Tat и Sec свидетельствует о периплазматической локализации этих белков, а разные типы сигнальных пептидов – свидетельство разных путей их биогенеза. Разные механизмы созревания гомологов Mrd и Mss – возможное объяснение отсутствия метаакрилатредуктазной активности в цитоплазматической фракции *D. acetiphilus*. Для восстановления метаакрилата оба белка-гомолога Mrd и Mss должны быть зрелыми, а этим условиям они удовлетворяют, находясь в периплазме.

Фумаратредуктазная активность у *D. acetiphilus*, видимо, - следствие активности цитоплазматическ(ой) фумаратредуктаз(ы), кодируемых(ой) одной из двух или обеими последовательностями (WP_013011266.1 и WP_013010243.1). Обе они относительно невелики, 231 и 235 аминокислот, обе соответствуют железо-серным белкам.

Ответственность за периплазматическую нитратредуктазную активность *D. acetiphilus*, наиболее вероятно, несёт молибдоптеринсодержащая оксидоредуктаза (WP_013009440.1), обладающая консервативным доменом связывания молибдата MorB, а также доменом NarA, характерным для нитратредуктаз типа Nas-Nar. Этот белок с молекулярной массой 88.7 кДа обладает отщепляемой сигнальной последовательностью типа Tat (31 амк) для транслокации в периплазму и участвует в окислении хинола с помощью тетрагемового мембраносвязанного Nar цитохрома *c*. Кроме того, в геноме *D. acetiphilus* обнаружены гены мультисубъединичной нитратредуктазы Nar №№ WP_013011334-013011337.1), располагающейся с внутренней стороны цитоплазматической мембраны.

Таким образом, *D. acetiphilus* обладает периплазматической метаакрилатвосстанавливающей активностью, что свидетельствует об адапционном потенциале анаэробной бактерии, а также о перспективах использования в биоремедиации.

Литература

1. Myhr S. and Torsvik T. Int J Syst Evol Microbiol. 2000. V.50. P.1611–1619.
2. Sanford R.A., Cole J.R., Tiedje J.M. AEM. 2002. V.68. №2. P.893–900.
3. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
4. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
5. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01068 «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метаакрилат»

Локализация редуктазных активностей у анаэробов-носителей метакрилатной редокс системы

Архипова О.В.¹, Бирюкова Е.Н.¹, Хохлова Г.В.¹, Абашина Т.Н.¹,
Ашин В.В.¹, Микулинская Г.В.²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, aroksan@gmail.com

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, г. Пущино

Уникальная метакрилатная редокс система *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*) (Галушко и др., 1996; Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999) имеет периплазматическую локализацию и состоит из двух хромопротеидов: флавиносодержащей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и её физиологического донора электронов – цитохрома *c* Mcc (30 кДа). Система Mrd+Mcc катализирует трансформацию метакрилата (ненасыщенного синтетического токсичного соединения, присутствующего в отходах метакрилатных производств) в изобутират (Галушко и др., 1994), при этом метакрилат служит терминальным акцептором восстановительных эквивалентов дыхательной цепи *G. sulfurreducens*.

Наиближайшие гомологи компонентов метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens*, чьи гены также организованы в единые транскрипты, были обнаружены нами ранее в геномах *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 (класс *Deltaproteobacteria*) и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809 (класс *Deferribacteres*) (Arkhipova et al., 2015). К началу наших исследований не существовало экспериментальных подтверждений наличия метакрилатного типа дыхания у бактерий каких-либо таксонов. Присутствие в геномах *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* гомологов белков метакрилатной редокс системы позволяет предполагать у этих организмов метакрилат- и акрилатредуктазную активности. Все упомянутые бактерии – ацетатооксиляющие анаэробы и представляют интерес для биоремедиации отходов бытового и промышленного происхождения.

Цель нашей работы – исследование активностей терминальных дыхательных редуктаз у анаэробных бактерий – обладателей генов-гомологов компонентов метакрилатной редокс системы, включая обнаружение и определение внутриклеточной локализации активностей терминальных дыхательных редуктаз, восстанавливающих метакрилат, акрилат, фумарат и нитрат у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*.

Активности терминальных редуктаз электрон-транспортных цепей у анаэробных бактерий *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* – а именно метакрилатредуктазы, акрилатредуктазы, фумаратредуктазы и нитратредуктазы – были измерены в суспензиях целых клеток (рис. 1). Все ферментативные активности определяли в двух вариантах: в присутствии пермебилизирующего внутреннюю мембрану детергента ЦТАБ (бромид цетилтриметиламмония) и без него. Для клеток *A. dehalogenans* были показаны процессы восстановления фумарата и метакрилата, при этом добавление ЦТАБ снижало скорость восстановления этих субстратов. Клетки *D. acetiphilus* были способны восстанавливать нитрат, фумарат и метакрилат, причем добавление ЦТАБ снижало активность восстановления нитрата и метакрилата, но сильно увеличивало активность восстановления фумарата.

Исследование внутриклеточной локализации процессов восстановления фумарата и метакрилата у *A. dehalogenans* с помощью разделения периплазматической и внутриклеточной фракций подтвердило наличие метакрилат- и фумаратвосстанавливающих активностей в периплазме. Кроме того, электрофоретически в периплазме были обнаружены среди прочих две белковых полосы, молекулярная масса которых, рассчитанная по логарифму подвижности, составила 47 кДа и 28 кДа (рис. 2).

Эти значения близки ожидаемым для зрелых гомологов Mrd и Mcc из *A. dehalogenans* 2CP-1 (Arkhipova et al., 2015).

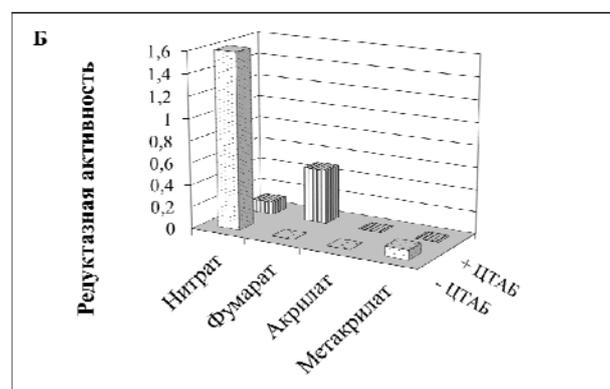
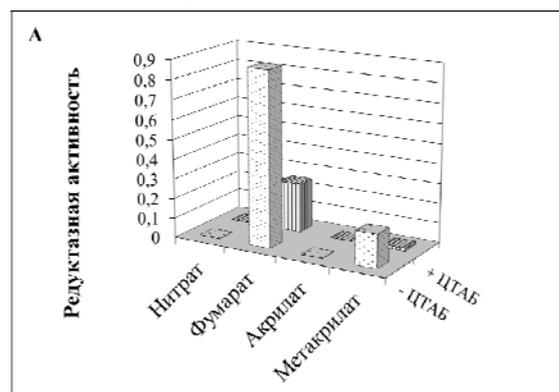
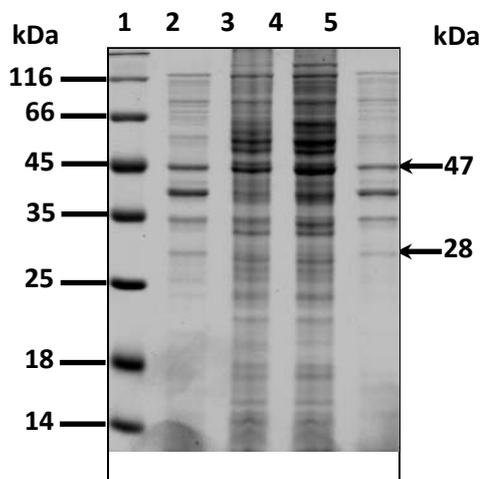


Рис. 1. Редуктазные активности *Anaeromyxobacter dehalogenans* (А) и *Denitrovibrio acetiphilus* (Б), мМ·мин⁻¹·на 1 мг белка

Рис. 2. Электрофореграмма белков клеточных фракций *Anaeromyxobacter dehalogenans*: 1- маркеры молекулярной массы, 2, 5 – периплазма, 3 – цитоплазма, 4 – целые клетки



Эксперименты по выявлению редуктазных активностей *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* позволяют предполагать у этих бактерий наличие способности восстанавливать метакрилат, причём локализован этот процесс в периплазме. Оба организма способны восстанавливать также фумарат: у *A. dehalogenans* фумаратредуктазный процесс - периплазматический, у *D. acetiphilus* - внутриклеточный. Кроме того, *D. acetiphilus* имеет периплазматическую нитратредуктазную активность. Акрилатредуктазная активность у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* используемыми методами обнаружена не была.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что анаэробные бактерии-носители генов-гомологов компонентов метакрилатной редокс системы обладают периплазматической метакрилатвосстанавливающей активностью. Метакрилатредуктазная активность у *A. dehalogenans* не является неспецифической активностью внутриклеточной фумаратредуктазы. Гипотеза о происхождении метакрилатной редокс системы от редуктазного комплекса, использующего в качестве субстрата токсичное природное соединение акрилат (Arkhipova et al., 2015), результатами пока не подтверждается.

Литература

1. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
2. Галушко А.С., Образцова А.Я., Штаркман Н.Б., Лауринавичюс К.С., Акименко В.К. ДАН. Серия биологическая. 1994. Т. 335. С. 382–384.
3. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888.
4. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01068-а «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

Аффинная очистка рекомбинантной метакрилатредуктазы *Geobacter sulfurreducens* AM-1 на сорбентах с триазиновыми красителями

Архипова О.В.¹, Захарова М.В.¹, Микулинская Г.В.²

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
г. Пушкино, aroksan@gmail.com

² ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пушкино

Метакрилатная редокс система *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*) (Arkhipova et al., 2015) использует метакрилат в качестве терминального акцептора электронов, трансформируя его в изобутират в периплазме бактерии. Эта ферментная система двухкомпонентна и включает в себя флавиносодержащую метакрилатредуктазу Mrd (50 кДа) и её физиологический донор электронов – цитохром *c* Msc (30 кДа) (Mikoulinskaia et al., 1999). Недавно нами была успешно осуществлена гетерологичная экспрессия гена метакрилатредуктазы в клетках *E.coli* (Захарова и др., 2017). Лишенная сигнальной последовательности кодирующая часть гена зрелого белка Mrd была клонирована в модифицированный плазмидный вектор pQE30, лишенный His-tag. Экспрессия гена в штамме *E.coli* M15, содержащем плазмиду pREP4, индуцированная ИПТГ, привела к получению целевого продукта, частично растворимого, а частично локализованного в цитоплазме в виде тел включения. Проблему растворимости удалось решить с помощью низкотемпературной экспрессии.

Целью настоящей работы стала разработка оптимального способа получения очищенного ферментного препарата рекомбинантной метакрилатредуктазы из клеток штамма-продуцента.

Для аффинной очистки FAD-содержащей метакрилатредуктазы были выбраны сорбенты Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, США) и Toyopearl AF-Red-650-ML (Tosoh, Япония), модифицированные различными триазиновыми красителями. Эти сорбенты известны своим высоким сродством к некоторым белкам, прежде всего ДНК- и нуклеотидсвязывающим, но также интерферону и альбумину.

Клетки *E.coli* M15(pREP4), трансформированные рекомбинантной плазмидой pQE30mrd, выращивали в суспензионной культуре на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, до плотности 0.6 единиц при длине волны 600 нм. Затем добавляли индуктор синтеза целевого белка - ИПТГ - до концентрации 200 мкМ и растили культуру в течение 12 часов при 23°C. Клетки центрифугировали при 6000 g в течение 5 минут и замораживали при -20°C. Для получения клеточных гомогенатов клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе CPX130 (Cole-Parmer, США) при мощности

75 Вт в течение 1 минуты (2 сессии по 30 с) в 50 мМ Трис-НСl буфере, содержащем 80 мМ КСl и 20 мМ β-меркаптоэтанола. Супернатант, полученный после осветления грубого экстракта центрифугированием (10000 g, 30 минут), наносили на мини-колонок с цветными сорбентами, уравновешенными тем же буфером. Промывку колонок вели 10 объемами стартового буфера. Результатом явилась полная сорбция целевого белка на колонках при значительном количестве примесных белков в промывочных фракциях (см. рис. 1). Емкость сорбента с Проиононовым Красным HE-3В оказалась несколько выше (10 мг/мл), чем с Цибаконом Голубым 3G (8 мг/мл).

В качестве буфера элюции в случае аффинных сорбентов часто используется буфер, содержащий лиганды или кофакторы (в нашем случае – FAD). Однако, против ожидания, попытка элюции целевого белка с обоих сорбентов буфером, содержащим 5 мМ FAD, успехом не увенчалась. По-видимому, сродство к данным триазиновым красителям метакрилатредуктазы оказалось выше, чем к кофактору. Однако, белок успешно элюировался с обоих сорбентов ступенчатым градиентом КСl в стартовом буфере. Концентрация КСl, достаточная для элюции, составила 0.5 М. Полученные ферментные препараты имели более 80% электрофоретической чистоты (см. рис. 1).

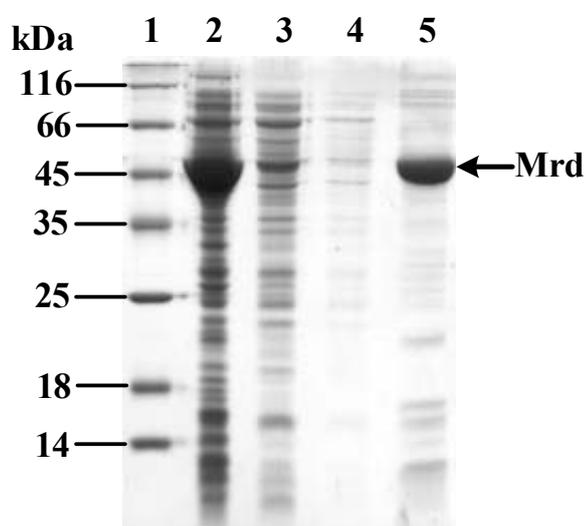


Рис. 1. Электрофореграмма белковых фракций на разных стадиях очистки рекомбинантной метакрилатредуктазы *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (хроматография на Toyopearl AF-Red-650-ML).

1. маркеры молекулярной массы,
2. грубый экстракт,
3. просок,
4. промывка,
5. очищенный элюат.

Таким образом, мы показали, что рекомбинантная метакрилатредуктаза анаэробной бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 успешно продуцируется аэробно в гетерологичной системе, а также разработали новый способ очистки фермента в одну стадию на сорбентах с триазиновыми красителями.

Литература

5. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
6. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.
7. Захарова М.В., Микулинская Г.В., Архипова О.В. Сборник тезисов IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» под редакцией д.б.н. Т.А. Решетиловой, Тула, изд-во ТулГУ, 2017. С. 54. ISBN 978-5-7679-3267-2.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01068-а «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

Выделение и характеристика β - литической протеазы *Lysobacter capsici*

Афошин А.С.¹, Кудрякова И.В.¹, Шишкова Н.А.², Торопыгин И.Ю.³, Васильева Н.В.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, г. Пущино

²Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, alex080686@mail.ru

Распространение в обществе патогенных микроорганизмов, множественно-устойчивых ко всем известным антибиотикам, ведет к интенсивному поиску и выделению из окружающей среды продуцентов новых антимикробных агентов – антибиотиков, пептидов, бактериолитических ферментов. Бактериолитические ферменты обладают важной особенностью - они не вызывают привыкания у патогенных микроорганизмов.

В ИБФМ РАН изучается грамотрицательная бактерия *Lysobacter capsici*, которая известна продукцией антимикробных агентов. Установлено, что культуральная жидкость этой бактерии обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus*), мицелиальных грибов (*Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus terreus*) и дрожжей (*Candida boidinii*, *Candida utilis*).

Для выделения бактериолитических ферментов *Lysobacter capsici* была разработана многоступенчатая схема очистки. В результате был выделен белок, обладающий бактериолитической активностью и идентифицированный с помощью MALDI-TOF как β - литическая протеаза (ЕС 3.4.24.32). Была проведена характеристика этого белка. Установлено, что оптимальными условиями для гидролиза автоклавированных клеток стафилококка являются: рН – 9,0, температура – 50°C, концентрация буфера – 5,0 мМ. Температура полуинактивации фермента составила 57°C. Ингибиторный анализ показал, что фермент полностью теряет свою активность при использовании ФМСФ в концентрации 10 мМ, пХМБ – 5,0 мМ, 1,10 – фенантролина – 5 мМ. Установлено, что катионы Zn^{2+} восстанавливают активность фермента после его обработки 1,10 – фенантролином. Замена Zn^{2+} в активном центре фермента на Cu^{2+} или Ni^{2+} приводила к ингибированию его активности. Показано, что катионы Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} ингибируют активность фермента на 93%, 99%, 69% соответственно.

Установлено, что пероксид водорода (1%), а также детергенты SDS (1%) и Triton X-100 (5%) ингибируют активность фермента на 33%, 45% и 89% соответственно.

β - литическая протеаза гидролизует казеин, гемоглобин, эластин, желатин, коллаген и азофибрин. Установлено, что в казеине этот фермент разрушает пептидные связи между Gly-Gly.

β - литическая протеаза *L. capsici* гидролизует живые клетки *S. aureus* 55 (MRSA) с высокой эффективностью (минимальная ингибирующая концентрация составляет – 2,85 мкг/мл).

Разработана гетерологичная система экспрессии гена β - литической протеазы. В качестве экспрессионного вектора использовали плазмиду рЕТ - 19mod, а в качестве экспрессионного штамма - *E.coli* BL21(DE3). Для рекомбинантного белка была разработана схема рефолдинга из телец включения.

Дальнейшее изучение β - литической протеазы *L. capsici* будет направлено на установление пространственной структуры, антимикробного потенциала и перспективы применения в качестве лекарственного антимикробного средства.

Новый вид актинобактерий *Haloactinopolyspora antiqua* sp.nov.

Барышникова Л.М., Автук А.Н., Арискина Е.В., Винокурова Н.Г.,
Дорофеева Л.В., Мачулин А.В., Евтушенко Л.И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, lbarysh@rambler.ru

Из содержимого сосуда для продуктов, найденного при археологических раскопках древних курганов в Калмыкии, нами был выделен штамм ВКМ Ас-2616, образующий мицелий. По сходству нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК штамм был наиболее близок к представителям рода *Haloactinopolyspora* (сем. *Jiangellaceae*) – *H. alkaliphila* (97.69%) и *H. alba* (96.92%) (Рис.1).

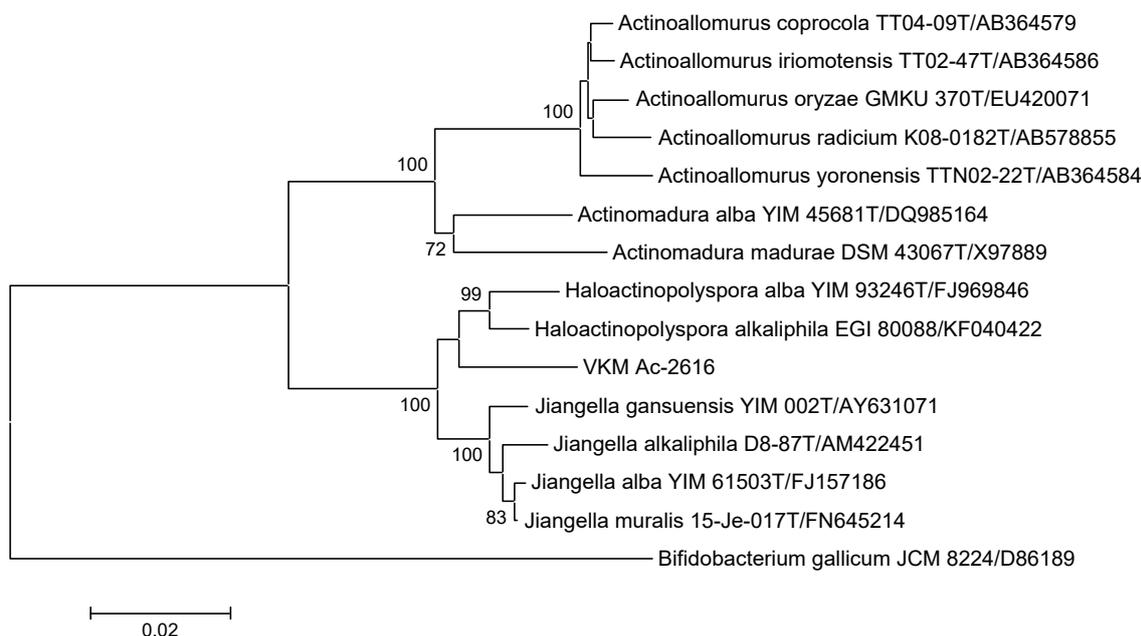


Рис 1. Филогенетическое положение штамма ВКМ Ас-2616^T на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК (алгоритм группировки «neighbour-joining»).

Штамм образует бесцветные, пастообразные, складчатые или гладкие колонии, которые формируются на поверхности и проникают в агар на всех диагностических ISP-средах. Белый воздушный мицелий может образовываться на некоторых средах. Растворимые пигменты отсутствуют. Вегетативные и воздушные гифы – тонкие (0,2-0,4 мкм в диаметре), разветвлённые, с возрастом слабо или интенсивно, в зависимости от состава питательной среды и условий культивирования, фрагментируются на палочковидные и кокковидные элементы (Рис.2). На ряде сред могут наблюдаться короткие цепочки спор.

Пептидогликан клеточной стенки содержит LL-диаминопимелиновую кислоту. В составе сахаров клеточной стенки найдены рамноза и неидентифицированный аминсахар. Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Основные жирные кислоты – антеизо-C_{15:0} и iso-C_{15:0}. В составе полярных липидов обнаружены фосфатидилглицерин (PG), дифосфатидилглицерин (DPG), ацилфосфатидилглицерин (AcPG) фосфатидилинозит (PI) и неизвестные фосфогликолипиды (PGL). Содержание ГЦ-пар в ДНК – 66,9 мол.%.

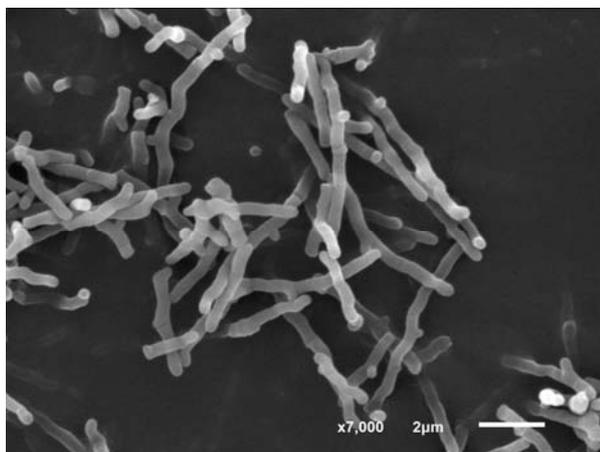


Рис.2. Вегетативные гифы штамма ВКМ Ас-2616
(сканирующая электронная микроскопия)

Штамм растет при 28°C на пептонно-дрожжевой среде в присутствии 0-7,5% NaCl и при исходных значениях pH 6–10; не растет при 6 и 37 °C. Использует в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-мальтозу, D-фруктозу, сахарозу, D-маннит, глицерин. Не использует D-галактозу, лактозу, L-рамнозу, раффинозу, сорбит, инозит целлюлозу. Не растет на среде без источника углерода. Гидролизует желатин, казеин, но не разлагает гипоксантин, крахмал, твин-80, ксантин, эскулин и мочевины. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительный.

В отличие от *H. alba* и *H. alkaliphila*, изученный штамм имеет более низкое содержание ГЦ-пар в ДНК, содержит ацилфосфатидилглицерин (AcPG) в составе фофолипидов, но не содержит фосфатидил-инозит-маннозид (PIM). Растет при более низких значениях температуры и концентрации соли (*H. alba* и *H. alkaliphila* способны расти при 37 и 45 °C и концентрациях NaCl 23% и 12,5%, соответственно (Tang et al., 2011; Zhang et al., 2014). Отличается от вышеупомянутых видов способностью утилизировать ряд источников углерода.

С учетом уровня сходства штамма ВКМ Ас-2616 с ближайшими видами рода *Haloactinopolyspora* по генам 16S рНК – 97,69% (*H. alkaliphila*) и 96,92% (*H. alba*), которое ниже порогового значения межвидового сходства (98,65%) (Kim et al., 2014), а также отличий от вышеупомянутых видов на уровне фенотипа, изученный штамм отнесен к новому виду рода *Haloactinopolyspora* – *Haloactinopolyspora antiqua* sp.nov.

Литература

1. Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 346-351.
2. Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Shi R, Lou K, Xu LH, Li WJ (2011) *Haloactinopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake, with proposal of *Jiangellaceae* fam. nov. and *Jiangellineae* subord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:194–200.
3. Zhang YG, Liu Qing, Wang HF, Zhang DF, Zhang YM, Park DJ, Kim ChJ, Li WJ (2014) *Haloactinopolyspora alkaliphila* sp. nov., and emended description of the genus *Haloactinopolyspora*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1945–1951

Антиоксидантные системы и стресс у дрожжей *Yarrowia lipolytica*

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, aarin@rambler.ru

Все аэробные микроорганизмы подвергаются действию активных форм кислорода (АФК), которые являются частично восстановленными формами молекулярного кислорода. АФК, включая, перекись водорода (H_2O_2), супероксидный анион радикал (O_2^-) и гидроксильный радикал (OH^\cdot), как известно, являются токсичными для клеток и вызывают окисление липидов, белков и ДНК [1, 2].

Механизмы адаптации представляют большой интерес для исследователей в связи с их ролью в эволюционных процессах, а также при реализации биосинтетических возможностей клетки. В ответ на действие оксидантов для поддержания концентрации АФК на безопасном уровне микроорганизмы могут синтезировать (или активировать) разного рода системы, поддерживающие редокс-потенциал в клетке [3].

В настоящей работе показано, что в процессе адаптации к различным стрессовым воздействиям в клетках *Yarrowia lipolytica* происходит увеличение активностей ферментов, тем или иным образом участвующих в уменьшении содержания АФК - каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы. В таблице представлены активности указанных ферментов в клетках в условиях окислительного стресса.

Табл. Активность антиоксидантных ферментов ($\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка) и дыхания ($\text{нмоль } O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ сухой биомассы) клеток *Y. lipolytica* в условиях окислительного стресса*

Параметры стрессового ответа	Активность			
	Экспоненциальная фаза роста (контроль)	Стационарная фаза роста (контроль)	Адаптированные клетки**	Клетки без адаптации
Выживаемость, % ***	100	85	95	0
Каталаза	28.0 ± 1.3	75.0 ± 4.3	120.0 ± 1.6	0
СОД	4.2 ± 0.45	8.4 ± 1.1	21.6 ± 2.3	0
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	73.0 ± 2.3	103.0 ± 4.0	138.2 ± 13.6	0
Глутатион-редуктаза	24.1 ± 2.1	69.2 ± 1.3	66.3 ± 7.6	0
Альтернативная оксидаза	0	32	6.5	0
Основная дыхательная цепь	15.8	10.9	16.5	0

*Условия окислительного стресса были смоделированы путём добавления в инкубационную среду 0.5 мМ менадиона инкубирования клеток в присутствии 0.5 мМ менадиона

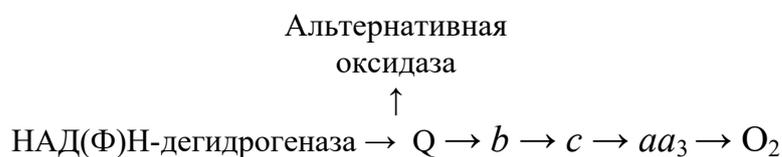
** - стресс устойчивые, адаптированные, клетки были получены в результате мягких стрессовых воздействий: низкая доза оксидантов (0.05 мМ менадион) или тепловая «закалка» (37 °С, 60 мин).

*** - выживаемость клеток после 30 мин стрессового воздействия.

Влияние стрессоров на клетки прямо или косвенно связано с образованием АФК, действие которых в конечном итоге и приводит к их гибели. Анализ литературных данных [4] свидетельствует о том, что одной из мишеней действия АФК могут являться митохондрии, в частности, дыхательная цепь. В то же время повреждение дыхательной цепи может прямо или косвенно приводить к образованию АФК на уровне убихинона. АФК вызывают перекисное окисление фосфолипида - кардиолипина, который необходим для активности цитохромоксидазы. Кроме того, АФК инактивируют переносчики электронов по дыхательной цепи, АТФазу, трансгидрогеназу и другие белки [5].

Ингибиторный анализ выявил участие в адаптивном ответе дрожжей альтернативной (цианидрезистентной), оксидазы. Как оказалось, альтернативный путь окисления более устойчив к действию стрессоров, нарушающих перенос электронов на цитохромном участке дыхательной цепи.

Альтернативный перенос электронов позволяет поддерживать окислительную активность, сохраняя при этом способность к синтезу АТФ в первом пункте сопряжения на уровне эндогенной НАДН-дегидрогеназы. Альтернативная оксидаза может присутствовать в митохондриях наряду с основной, цитохромной, дыхательной цепью. Однако цианид-резистентный путь окисления не способен конкурировать за электроны с основной цитохромной дыхательной цепью, по нему переносятся на кислород только избыточные восстановительные эквиваленты [6].



Следует особо отметить, что увеличение активностей антиоксидантных ферментов наряду с появлением альтернативной оксидазы наблюдалось также у клеток из стационарной фазы роста. При этом клетки из стационарной фазы роста - более устойчивы ко всем используемым в работе стрессорам, чем клетки экспоненциальной фазы (неадаптированные).

Эти результаты важны при сопоставлении физиологических реакций клеток стационарной фазы роста (например, при исчерпании субстрата) и «ответов» на стрессовые воздействия. При этом следует учитывать, что в стационарной фазе роста отсутствует такой фактор, как «внезапность».

Защита от АФК носит системный характер и обеспечивается не только СОД, каталазой, пероксидазой или другими перехватчиками АФК и антиоксидантами, но и ферментами, на первый взгляд, не имеющими к перехвату радикалов прямого отношения.

Так, в стрессовых условиях отмечалось увеличение активности НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы. (Активность НАДФ⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы не была обнаружена). Увеличение активности этого фермента можно считать естественным для дрожжей, способных использовать этанол в качестве единственного источника углерода и энергии [7]. Но повышение активности этого фермента при адаптации к стрессовым условиям заслуживает особого внимания.

Изменения на уровне антиоксидантного и энергетического статусов согласуются с изменениями ультраструктуры клеток в стрессовых условиях.

Аналогичные результаты получены в условиях окислительного, теплового, холодного или этанольного стрессов.

Литература

1. *Imlay J.A., Linn S.* // Science. 1988. V. 240. № 4857. P. 1302-1309.
2. *Jamieson D.J.* // Redox Rep. 1995. V. 1. № 1. P. 89-95.

3. Kern A., Hartner F.S., Freigassner M. et al. // *Microbiology*. 2007. V. 153. № 4. P. 1250-1260.
4. Davidson J.F., Whyte B., Bissinger P.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 5116-5121.
5. Lenaz G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1366. № 1-2. P. 53-67.
6. Medentsev A.G., Arinbasarova A.Y., Golovchenko N.P. et al. // *FEMS Yeast Res.* 2002. V. 2. P. 519-524.
7. Ильченко А.П., Чернявская О.Г., Финогенова Т.В. // *Прикл. Биохим. и микроб.* 2005. Т. 41. С. 487-494.

Изучение генов деградации стероидных соединений у штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817Д – продуцента 9 α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-диона с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК

Брагин Е.Ю.¹, Довбня Д.В.¹, Штратникова В.Ю.^{2,3}, Щелкунов М.И.^{2,4}, Донова М.В.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, bragory@yandex.ru

² Сколковский институт науки и технологий, г. Москва,

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, г. Москва

⁴ Институт проблем передачи информации имени А. А. Харкевича РАН, г. Москва

Стероидные соединения активно применяются в различных областях медицины. Производство фармацевтических субстанций стероидов основано на комбинированном химико-микробиологическом синтезе, включающем этап биотрансформации стероидов в ключевые стероидные прекурсоры, в том числе, 9 α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9ОН-АД) [1].

Штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817Д способен трансформировать стероиды с накоплением 9ОН-АД в качестве основного продукта [2]. Тем не менее, биотехнологическая эффективность данного биокатализатора ограничена из-за наличия слабой 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активности, приводящей к частичной деструкции целевого продукта. Ранее нами было осуществлено полногеномное секвенирование и сборка генома данного штамма [3]. Для улучшения свойств штамма методами метаболической инженерии необходима идентификация потенциальных генов-мишеней, вовлеченных в стероидный катаболизм.

Цель данной работы – выявление генов, изменяющих уровень экспрессии в присутствии 9ОН-АД, а также фитостерина с помощью полнотранскриптомного секвенирования.

Для этого были получены контрольные и индуцированные 9ОН-АД или фитостерином (смесь растительных стероидов, содержащая 78% β -ситостерина) культуры. Были выделены (с использованием Qiagen RNeasy mini kit, Qiagen) и очищены (с помощью DNКазы I и Ribo-Zero ribosomal RNA Removal Kit, Epicenter) препараты мРНК полученных культур и осуществлено высокопроизводительное секвенирование мРНК на секвенаторе HiSeq 2000 (Illumina). Получены и проанализированы дифференциальные транскриптомные профили; ген считали достоверно увеличивающим свою экспрессию, если таковая в присутствии индуктора была в 3 и более раз выше (при q-value менее 0,01), чем в варианте сравнения.

Было показано, что в присутствии фитостерина достоверно увеличивалась экспрессия 262-х генов, в числе которых были идентифицированы ортологи большинства известных генов с ранее подтвержденными или предполагаемыми функциями в катаболизме стероидов. В частности увеличивалась экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты окисления боковой цепи стероидов, а также гены, контролирующие

начальные (окисление колец А и В) и поздние (раскрытие колец С и D) стадии окислительной деградации стероидного ядра.

В присутствии 9ОН-АД происходило увеличение экспрессии 82-х генов, из которых 59 увеличивали свою экспрессию также в присутствии фитостерина. Экспрессия трёх генов – G155_25945, G155_27755 и G155_15675 увеличивалась в присутствии 9ОН-АД, но уменьшалась в присутствии фитостерина. Все известные гены деградации колец С и D увеличивали свою экспрессию в присутствии 9ОН-АД.

Большинство генов окисления боковой цепи стероидов не увеличивали своей экспрессии в присутствии 9ОН-АД, вместе с тем, некоторые из них оказались 9ОН-АД-индуцируемыми. В частности, увеличивалась экспрессия генов *ltp3*, *ltp4* и *fadE27*. Кроме того, гены *echA19*, *fadA5*, *fadD17* и *fadD19*, увеличили свою экспрессию в 2-2,5 раза. Известно, что экспрессия данных генов контролируется транскрипционным регулятором KstR, и индуцируется 3-оксо-холестеновой кислотой [5], которая образуется на ранних стадиях окисления холестерина, но не может образовываться при катаболизме 9ОН-АД. Увеличение экспрессии данных генов в присутствии 9ОН-АД указывает на то, что у исследуемого штамма помимо KstR могут существовать иные способы регуляции экспрессии генов окисления боковой цепи стероидов.

В геноме исследуемого штамма нами было ранее обнаружено 5 генов, схожих с известными генами 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназы [4]. В присутствии фитостерина увеличилась (в 61 раз) экспрессия только одного из этих генов – *kstD_1* (G155_04625). Напротив, в присутствии 9ОН-АД экспрессия данного гена не изменялась, в отличие от *kstD_5* (G155_20890), экспрессия которого увеличивалась в 10 раз. Следует отметить, что *kstD_5* из всех потенциальных генов 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназ исследуемого штамма в наименьшей степени схож с известными генами, обладающими такой функцией. Если кодируемый геном *kstD_1* белок схож с KstD *M. smegmatis* mc² 155 (ABK75912.1) на 81% (указан процент идентичных аминокислот), то *kstD_5* – всего на 40%.

Также в присутствии 9ОН-АД было выявлено увеличение экспрессии ряда генов, относительно схожих с известными генами стероидного катаболизма. В частности, отмечено 10-кратное увеличение экспрессии гена ацил-КоА-тиолазы G155_20900, сходство которого с *fadA5 Rhodococcus jostii* RHA1 составляет 37%. При этом G155_20900, как и *kstD_5* не были отнесены нами к группе фитостерин-индуцируемых по причине высокого q-value (> 0,01), что по-видимому обусловлено низким уровнем базовой экспрессии.

Полученные данные позволяют предположить, что деградация 9ОН-АД исследуемым штаммом может быть связана именно с экспрессией гена *kstD_5*, в то время как продукт гена *kstD_1*, играющий ключевую роль в образовании Δ^1 -интермедиатов у других микобактерий, по-видимому, не активен у *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817Д. В противном случае 9ОН-АД не мог бы накапливаться, как основной продукт превращения стероидов данным штаммом.

Таким образом, получены массивы данных о экспрессии генов *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817Д в присутствии фитостерина и 9ОН-АД. Кроме того, в геноме данного штамма выявлен ген, который, с высокой степенью вероятности, вовлечен в модификацию и деградацию целевого стероидного продукта. Найденный ген является приоритетной мишенью генетической инженерии с целью улучшения биотехнологических свойств изучаемого штамма. Полученные результаты вносят вклад в понимание генетического контроля путей катаболизма стероидов.

Благодарности:

Работа проводилась при поддержке Российского Научного Фонда (Соглашение № 18-14-00361).

Литература

1. Донова, М. В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пущино: Изд-во ОНТИ ПНЦ РАН, 2010.
2. Donova M.V., Dovbnya D.V., Sukhodolskaya G.V., Khomutov S.M., Nikolayeva V.M., Inchan Kwon and Kyuboem Han. (2005) Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80:55-60
3. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Pekov Y.A., Bragin E.Y., Ashapkin V.V., Donova M.V. (2015) Complete genome sequence of *Mycobacterium* sp. strain VKM Ac-1817D, capable of producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from phytosterol. *Genome Announcements*. 3: 1-2. DOI:10.1128/genomeA.01447-14
4. Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Dovbnya D.V., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Malakho S.G., Egorova O.V., Ivashina T.V., Sokolov S.L., Ashapkin V.V., Donova M.V. (2013) Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 138: 41–53.

Функции ферментов серинового цикла ассимиляции формальдегида у метанотрофов I типа

Бут С.Ю., Егорова С.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, flash20063@rambler.ru

Бактерии, использующие метан в качестве ростового субстрата, ассимилируют углерод посредством трех циклических биохимических путей – серинового, рибулозомонофосфатного (РМФ) или рибулозобисфосфатного (РБФ). Сериновый путь начинается реакцией конденсации формальдегида (в форме оксиметилтетрагидрофолата) и глицина с образованием серина, из которого далее в реакции переаминирования с глиоксилатом образуется гидроксипируват. Восстановление гидроксипирувата в глицерат катализируется гидроксипируватредуктазой, причем высокая активность этого фермента служит индикатором функционирования серинового пути. В РМФ пути первичное образование С-С связи происходит при конденсации формальдегида и рибулозо-5-фосфата с образованием гексулозо-6-фосфата, распад этого шестиуглеродного фосфосахара приводит к синтезу триоз. РМФ цикл энергетически наиболее выгодный путь С1-ассимиляции и характерен для быстрорастущих метилотрофов. В РБФ пути (цикле Кальвина) фиксируется углекислота, образующаяся при окислении восстановленного С1-субстрата. При первичной расшифровке метаболизма метилотрофов полвека назад данные пути рассматривались как альтернативные в каждой группе этих бактерий. Однако анализ доступных в настоящее время геномов метанотрофов показывает, что гены, кодирующие ферменты серинового цикла присутствуют у всех представителей, в том числе, у бактерий, реализующих РМФ путь и/или цикл Кальвина. Единственным исключением являются метанотрофы, относящиеся к филуму *Verrucomicrobia*, и реализующие исключительно цикл Кальвина.

Ранее с помощью гетерологичной экспрессии в *E. coli* с последующей очисткой и характеристикой ферментов нами была продемонстрирована функциональность серин-глиоксилатаминотрансферазы (Sga), гидроксипируватредуктазы (Hpr) и малил-КоА лиазы у метанотрофа I типа *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. Однако их роль у данного метанотрофа, использующего РМФ-цикл в качестве основного пути ассимиляции формальдегида, остаются неясными.

С помощью инсерционного мутагенеза нами были получены штаммы *Methylomicrobium alcaliphilum* с инактивированной серин-глиокилатаминотрансферазой (Δ sga), малил-КоА лиазой (Δ mcl), а также одновременно инактивированными Sga и Hpr (Δ sgahpr). Обнаружено, что скорость роста мутантов Δ sga и Δ sgahpr была ниже, чем штамма дикого типа. Причем при росте на метаноле данный эффект был более выражен. Интересно, что при пересеве с метана на метанол у мутантов наблюдалась продолжительная лаг-фаза (около 96 ч). При росте на метаноле *Methylomicrobium alcaliphilum* накапливает в культуральной жидкости формальдегид во время экспоненциальной фазы роста. По всей вероятности, это объясняется несбалансированностью скоростей окисления метанола и вовлечения образовавшегося формальдегида в метаболизм. При переходе в стационарную фазу роста штамм дикого типа полностью метаболизирует накопленный формальдегид, в то время как у мутантов Δ sga и Δ sgahpr формальдегид присутствовал в среде даже после того, как рост культуры останавливался. Данные факты говорят о том, что *M. alcaliphilum* 20Z может использовать сериновый путь для удаления цитотоксичного формальдегида, образующегося в условиях избытка источника углерода. У штаммов Δ sga и Δ sgahpr при росте на метаноле отмечено увеличение внутриклеточного пула ацетата, цитрата и α -кетоглутарата, что по всей видимости обусловлено интенсификацией РМФ-цикла и/или фосфокетолазного пути (Табл. 1). Примечательно, что такого эффекта не наблюдается при росте на метане, что подтверждает функционирование серинового цикла только в условиях избытка C1-соединений. Также у штамма Δ sgahpr обнаружено увеличение пула аланина по сравнению с штаммами 20Z и Δ sga. Известно, что геном *M. alcaliphilum* 20Z кодирует аланиндегидрогеназу, катализирующую взаимопревращения аланина и пирувата, происходящее с затратой/образованием восстановительных эквивалентов НАДН. Увеличение внутриклеточного содержания аланина при инактивации Hpr может означать участие гидроксипируватредуктазы в поддержании восстановительного потенциала клетки.

Табл. 1. Внутриклеточное содержание метаболитов у дикого и мутантных штаммов *M. Alcaliphilum*

	Ацетат, мкмоль/г биомассы	Цитрат, мкмоль/г биомассы	α - кетоглутарат, мкмоль/г биомассы	Глутамат, мкмоль/г биомассы	Аланин, мкмоль/г биомассы
CH₄					
20Z	1.3±0.4	0.9±0.1	0.004±0.002	8±2	0.65±0.02
Δ sga	1.6±0.5	0.51±0.01	0.004±0.002	7±1	0.7±0.1
Δ sgahpr	1.78±0.05	0.4±0.1	0.006±0.003	8±2	1.0±0.1
CH₃OH					
Δ 20Z	0.7±0.3	0.11±0.05	0	9±2	1.5±0.2
Δ sga	5.8±0.5	0.26±0.02	0.023±0.003	10±1	1.58±0.05
Δ sgahpr	2.4±0.2	0.55±0.05	0.016±0.003	9±1	3.9±0.3

Полученный мутантный штамм Δmcl оказался неспособен расти без добавления в среду глицина. По всей видимости, использования малаттиокиназы и малил-КоА лиазы является единственным путем синтеза глиоксилата у *M. alcaliphilum* 20Z. В свою очередь, трансаминирование с переносом аминоксигруппы на глиоксилат является единственным способом синтеза глицина, что и приводит к ауксотрофности штамма Δmcl .

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 17-04-11113.

Микроорганизмы с фенолдеградирующими свойствами из очистных сооружений

***Быков А.Г.¹, Кувичкина Т.Н.¹, Носулич В.Е.², Макаренко А.А.³,
Решетилов А.Н.¹***

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
kuv@ibpm.pushchino.ru

² Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева Самара
³ООО Эмульсионные технологии Самара

Наиболее перспективным методом утилизации фенола является его биodeградация с помощью микроорганизмов. Использование микроорганизмов, выделенных с мест загрязнения, обеспечит очистку среды без внесения в нее других химических соединений и чужеродной биоты. Это обуславливает необходимость поиска микроорганизмов, обладающих фенолдеградирующими свойствами. Такой подход был использован при поиске фенолдеградирующих микроорганизмов из почв месторождений Западной Сибири [1]. Из загрязненных нефтью почв в районе г. Самара выделен штамм *Rhodococcus opacus* 1G, способный использовать в качестве единственного источника углерода и энергии фенол [2]. Целью работы являлось выделение микроорганизмов, обладающих фенолдеградирующими свойствами. В работе использовали две пробы: почвы из промзоны г. Самара и высушенный активный ил с очистных сооружений предприятия «Нижекамскнефтехим» г. Нижекамск. Пробы высевали на чашки Петри на твердой селективной питательной среде Е (с фенолом в качестве единственного источника углерода и энергии), выдерживали при 28°C до появления роста. Произвели пересев проросших микроорганизмов на свежую среду Е с целью получения единичных колоний. Клетки, смытые буфером с плотной среды, отделяли центрифугированием, дважды промывали буфером и использовали для иммобилизации. Иммобилизацию проводили методом физической адсорбции на нейтральном носителе (хроматографическая стеклотруба GF/A). Рецепторный элемент помещали на кислородный электрод типа Кларка, который использовали в качестве преобразователя. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода в измеряемом образце. Из проб почвы промзоны г. Самара и высушенного активного ила из очистных сооружений предприятия «Нижекамскнефтехим» г. Нижекамска после трех пассажей среде Е были получены изоляты САВ-1 и НКВ-2 соответственно. Единичные колонии полученных изолятов были визуально однородны. Изолят НКВ-2 в качестве основы биорецептора не показал ответа при введении фенола в систему. В то время как изолят САВ-1 может быть биорецептором амперометрического биосенсора для определения фенола. Нижний предел определения составил 9 мкМ. Время измерения указанного соединения не превышало 20 мин. При микроскопии препарата, приготовленного из изолята САВ-1 (объектив иммерсионный, 100-кратный) было обнаружено два основных микроорганизма. Представляет интерес выяснить, за счет чего наблюдается значительный ответ при введении фенола.

Авторы выражают благодарность В.В. Дмитриеву и А.Н. Звонареву за фотографии препарата изолята САВ-1.

Литература

1. Макаренко А.А., Безвербная И.И., Кошелева И.А., Кувичкина Т.Н., Решетиллов А.Н. Бактерии из почв месторождений Западной Сибири // Прикл. Биохим. Микробиол. 2002. Том 38. №1. С. 29-34.
2. Шумкова Е.С., Соляникова И.П., Плотникова Е.Г., Головлева Л.А. Разложение фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 1G // Прикл. Биохим. Микробиол. 2009. Том 45. № 1. С.51-57.

Глюкоза вызывает первичный некроз в клетках *Saccharomyces cerevisiae* находящихся в логарифмической стадии роста

Валиахметов А.Я., Звонарёв А.Н., Сузина Н.Е.

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

Относительно недавно было обнаружено, что инкубация стационарных клеток дрожжей с водным раствором глюкозы приводит к гибели клеток. Это явление получило название «sugar induced cell death» (SICD). Дальнейшая инкубация с глюкозой завершается разрушением клеток – вторичным некрозом. Т.е. некроз является логическим завершением апоптотических процессов в клетке. Считается, что первичный некроз – гибель клетки без видимых признаков предшествующего апоптоза – происходит вследствие серьёзных повреждений, вызванных внешними факторами. Некроз, в отличие от апоптоза, в первую очередь характеризуется нарушением целостности плазматической мембраны (ПМ).

Нами показано, что инкубация дрожжей, находящихся в логарифмической стадии роста, с глюкозой приводит к быстрому увеличению числа клеток, накапливающих propidium iodide (PI) и 70 кДа FITC-dextran (FD). За 60 минут $22,1 \pm 2,5\%$ клеток накапливали PI. При дальнейшей инкубации число окрашенных клеток не увеличивалось. Накопление FD происходит в несколько меньшем числе клеток ($18,6 \pm 1,5\%$) что может быть объяснено его гораздо большей молекулярной массой (70 kDa) и соответственно большим размером – 5,8 нм. Наличие на ПМ разрывов такого размера уже само по себе позволяет констатировать смерть клетки. Тест на выживаемость показал, что инкубация с глюкозой приводит к снижению числа жизнеспособных клеток на $23,2 \pm 5,3\%$, что хорошо совпало с долей окрашенных PI клеток. На наличие разрывов на ПМ указывает также потеря внутриклеточного Pi, коррелирующая с ростом числа PI окрашенных клеток. Электронная микроскопия также показала наличие больших разрывов на плазматической мембране, разрушение внутриклеточных органелл и массивное выход хроматина из ядра в цитозоль, что характерно для некроза. Анализ морфологии ядра, после окраски DAPI показал типичные признаки некроза (разбухание ядра, вытекание хроматина в цитозоль), но не показала характерную для апоптоза конденсацию хроматина у ядерной мембраны.

Следующим характерным для апоптоза изменением является экстернализация фосфотидилсерина (PS) на внешнюю поверхность плазматической мембраны. Совместная окраска Annexin V и PI клеток инкубированных с глюкозой и апоптотических клеток (обработанные 3% H₂O₂) показала чёткое различие между клетками с SICD и апоптотическими. Инкубация с глюкозой приводит в основном к первичному и вторичному некрозу, не выявляя популяцию клеток, окрашенных только Annexin V. Популяция клеток

со вторичным некрозом, скорее всего представляют часть клеток, в которых Annexin связался с PS на внутренней поверхности мембраны. Это возможно, учитывая размер разрывов на ПМ (не менее 5,8 нм) и принимая во внимание молекулярный вес Annexin V ~ 36 kDa (что ниже, чем молекулярный вес FD).

Известно, что обработка клеток циклогексимидом (CHX) приводит к подавлению развития апоптоза. Преинкубация клеток *S. cerevisiae* SYE6210 со 100 мкМ CHX показала, что ингибитор не изменяет число PI-окрашенных клеток. Т.е. смерть клеток при инкубации с глюкозой не сопряжена с синтезом белков *de novo* имеющим место при апоптозе.

Следующим вопросом было выяснение роли свободных радикалов (ROS) в наблюдаемом процессе смерти клеток *S. cerevisiae* SYE6210. ROS вызывают гибель клеток как по некротическому пути, так и по апоптозному. Количество клеток с ROS увеличивается со временем инкубации с глюкозой и идёт параллельно количеству PI-окрашенных клеток. Т.е. ROS вызывает SICD у клеток дрожжей как на логарифмической стадии роста, так и в стационарной фазе. В обоих случаях токсичное действие ROS успешно подавляется 10 мМ аскорбиновой кислотой. Необходимо отметить, что количество клеток с ROS несколько превышает количество PI-окрашенных клеток. Мы предполагаем, что для проявления некротического эффекта необходимо время и/или достаточная концентрация ROS. Однако остаётся без ответа вопрос качественного описания популяции подверженной SICD. Тот факт, что ROS вызывает SICD как у стационарных дрожжей, так и у находящихся в логарифмической стадии роста на первый взгляд показывает зависимость вида клеточной смерти (апоптоз vs. некроз) от хронологического возраста клеточной культуры. Однако надо принять во внимание то, что в стационарной стадии роста клетки находятся в G0 фазе. Дрожжи в экспоненциальной стадии роста представляют собой гетерогенную популяцию с клетками во всех стадиях клеточного цикла G1/S/G2/M. Анализ клеточного цикла клеток в экспоненциальной фазе роста показал, что клетки в S-фазе (23%), по крайней мере количественно, являются кандидатами на SICD. Чтобы проверить это предположение мы проверили способность глюкозы вызывать SICD на частично синхронизированной культуре *S. cerevisiae* CRN. Пик приходится на временной интервал 10-30 минут с момента переноса клеток на свежую среду, что предполагает нахождение клеток в S-фазе или в процессе перехода из G1 в S фазу. Также известно, что клетки в S-фазе более чувствительны к ROS. Интересно отметить также, что дрожжевая про-апоптотическая метакаспаза Yca1 (вовлечённая в апоптоз) принимает непосредственное участие в G1-S переходе. Т.е. клетки в S-фазе являются наиболее подверженными цитотоксическому эффекту ROS, что ведёт либо к апоптозу с участием Yca1, либо, как в нашем случае, к первичному некрозу.

Выводы. Совокупность представленных данных показывают, что SICD у экспоненциально растущих клеток имеет природу первичного некроза. В пользу этого говорят следующие наблюдения: 1) скорость процесса; 2) нарушение целостности плазматической мембраны; 3) серьёзные морфологические изменения внутриклеточного содержимого – разрыв ядерной мембраны с последующим вытеканием хроматина в цитозоль, разрушение вакуоли и митохондрий; 4) отсутствие конденсации хроматина; 5) отсутствие экстернализации PS на внешнем слое ПМ; 6) нечувствительность процесса SICD к CHX. Мы также предполагаем, что SICD происходит в субпопуляциях клеток в S-фазе.

Развитие концепции баркодинга грибов

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино,
ovvasilenko@gmail.com

Концепция баркодирования живых объектов (программа Barcoding of Life, BOL) появилась как максимально простая практическая задача молекулярного типирования (www.ibol.org) на базе филогенетического плейсмента. Плейсмент (типирование, позиционирование) без филогении, а посредством простого статистического сравнения с образцовой последовательностью - вот его идея. В качестве универсальной баркодинговой последовательности был выбран ген COI -митохондриальной цитохром С оксидазы (субъединицы I), так как эта последовательность представлялась достаточно вариабельной, чтобы различать варианты на межвидовом уровне.

Появившись как сугубо практическая задача, баркодинг предполагал, что именно для успешного практического применения необходимы наиподробнее надежные базы данных типовых последовательностей. Их составление по единому стандарту - это продолжающаяся глобальная фундаментальная научная задача, которая уже заметно и положительно повлияла на смежные фундаментальные области: молекулярную систематику и метагеномику, например. Такой вариант последней, как "глубокое секвенирование целевых последовательностей" получило благодаря влиянию баркодирования новое емкое название "метабаркодирование", так как практически полностью основано на использовании баз баркодинга. И даже давно и самостоятельно возникшее 16S-типирование в бактериологии, которое пока редко называют "баркодингом", в варианте метагеномики однозначно стало "16S-метабаркодированием".

Со своего рождения в 2003-2004 годах, в форме подчеркнуто примитивной идеи, баркодирование претерпело к настоящему времени значительные изменения. Ген COI, хорошо себя зарекомендовавший себя для баркодирования позвоночных и беспозвоночных животных и многих форм одноклеточных, менее пригоден для высших водорослей и растений и совсем не пригоден для грибов из-за сложной интронной структуры. В качестве основного локуса в 2012 г. международным консорциумом по баркодингу грибов был принят участок ITS, включающий оба транскрибируемых спейсера рДНК и ген 5.8S субъединицы рибосом (Schoch et al., 2012). Две основные проблемы заставляют концепцию баркодирования трансформироваться вглубь - необходимость различать близкие формы, а также - типировать, соотносить со стандартами те баркоды, которые оказываются в промежуточном положении. Для форм жизни, которым "подошла" COI, это решается применением кластерного анализа к базам данных, выделением OTU, которые в большинстве случаев хорошо соотносятся с существующими таксонами. Это явное сближение с идеологией кладистического анализа, на котором основана филогенетика.

Для других форм, особенно для грибов, ситуация сложнее. Незнученность плюс богатство биоразнообразия и несовершенство систематики очень часто приводят к тому, что только по ITS невозможно даже приблизиться к идентификации образца на видовом уровне и даже хоть как-то связать с таксонами более высокого порядка. Обязательное и неизбежное размещение таких последовательностей в базе DDBJ/ENA/GenBank уже привело к заметному "захлавлению", которое быстро нарастает. Очень распространена ситуация, когда не хватает вариабельности баркода для дискриминации видов. Эти проблемы решают введением дополнительных локусов баркода в ущерб простоте и практичности. При этом де-факто переходят на инструменты филогенетики, особенно в условиях неполноты баз данных по дополнительным баркодам. Мы считаем наилучшим компромиссом в этом направлении использование удлиненного локуса баркода за счет включения в него расположенных рядом (что очень кстати) важнейших дополнительных локусов, расположенных на гене большой субъединицы рибосом (28S, домены D1, D2, D3). С 2016 года мы развиваем проект, цель которого - убедить научное сообщество принять расширенную (удлиненную) версию баркода в качестве основной (ITS- D1, D2, D3) (www.researchgate.net/project/The-advanced-fungal-barcode). Такая версия имеет

практически прежнюю методическую простоту монолокусного баркодинга, но обладает методической мощностью мультилокусного. Размер участка удобен и для подхода Сэнгера и для современных платформ HTS третьего поколения. Мы применяем его как для исследования микобиоты высокоширотных экотопов, так и для характеристики собственно коллекции ВКМ (Василенко и др., 2016, Kochkina et al., 2018). Подход позволяет сочетать баркодинг и филогению, не только типировать известные виды и выявлять новые, но и выявлять более крупные таксоны (порядок в классе *Leotiomycetes*, семейство/род в порядке *Thelebolales*). Только при подготовке к геномному секвенированию десяти штаммов грибов для проекта по сравнительной геномике класса леотиомицетов удлиненный баркодинг позволил изменить таксономию трех штаммов из коллекции ВКМ, выявить таксономические несоответствия для двух штаммов из CBS, выявить тонкую филогенетическую структуру рода *Pseudoeurotium* (*P.zonatum* - комплекс видов) и, главное, отобрать наиболее репрезентативные образцы.

Мы далеко не одиноки на пути к удлиненному баркодингу. Подобное предложение было сделано еще в 2010 году (Stockinger et al., 2010), но в последние 2 года наблюдается всплеск. Так, отмечена радикально возросшая информативность (регион ITS-D1/D2) при баркодинге медицински значимых грибов (Colabella et al., 2018), фактически создана многотысячная база данных для длинного баркодинга грибов (ITS+ D1/D2, часто и +D3) на основе секвенирования фондов CBS (Vu et al., 2019). Еще более длинный участок, включающий ITS, с интересными результатами позволяет использовать технология PacBio для метабаркодирования (Tedersoo et al., 2017; Heeger et al., 2018). Мы полагаем, что движение к новому стандарту баркодинга неотвратимо и планируем играть активную роль в этом процессе.

Литература

1. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V.109, No. 16, P. 6241-6246, <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
2. Василенко О.В., Иванушкина Н.Е., Стародумова И.П., Кочкина Г.А., Данилогорская А.А., Озерская С.М. 2016. Применение мультилокусного тандемного филогенетического анализа для идентификации природных изолятов и коллекционных культур грибов. III Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». 5-9 декабря 2016. Пушкино. Материалы конференции. С. 67-69.
3. Kochkina, G.A., Ivanushkina, N.E., Lupachev, A.V. Starodumova I.P., Vasilenko O.V., Ozerskaya S.M. 2018. Diversity of mycelial fungi in natural and human-affected Antarctic soils // *Polar Biol.* <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2398-y>.
4. Stockinger H., Kruger M., Schubler A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi // *New Phytol.*, V. 187, P. 461–474. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x>.
5. Colabella C., Corte L., Roscini L., Bassetti M., Tascini C., Mellor J.C, Meyer W., Robert V., Vu D., Cardinali G. 2018. NGS barcode sequencing in taxonomy and diagnostics, an application in "*Candida*" pathogenic yeasts with a metagenomic perspective // *IMA FUNGUS*, V. 9, No 1, P. 91–105. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2018.09.01.07>.
6. Vu D., Groenewald M., de Vries M., Gehrman T., Stielow B., Eberhardt U., Al-Hatmi A., Groenewald J.Z., Cardinali G., Houbraken J., Boekhout T., Crous P.W., Robert V., Verkley G.J.M. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation // *Studies in Mycology*, V.92, P. 135-154, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>.

7. Tedersoo L., Tooming - Klunderud, A., Anslan, S. 2018. PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives // *New Phytol*, V. 217, P. 1370-1385. doi:10.1111/nph.14776.
8. Heeger F, Bourne E.C, Baschien C., Yurkov A., Bunk B., Spröer C., Overmann J., Mazzoni C.J., Monaghan M.T. 2018. Long - read DNA metabarcoding of ribosomal RNA in the analysis of fungi from aquatic environments // *Mol Ecol Resour*, V. 18, P. 1500–1514. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12937>.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01347 (Василенко О.В.)

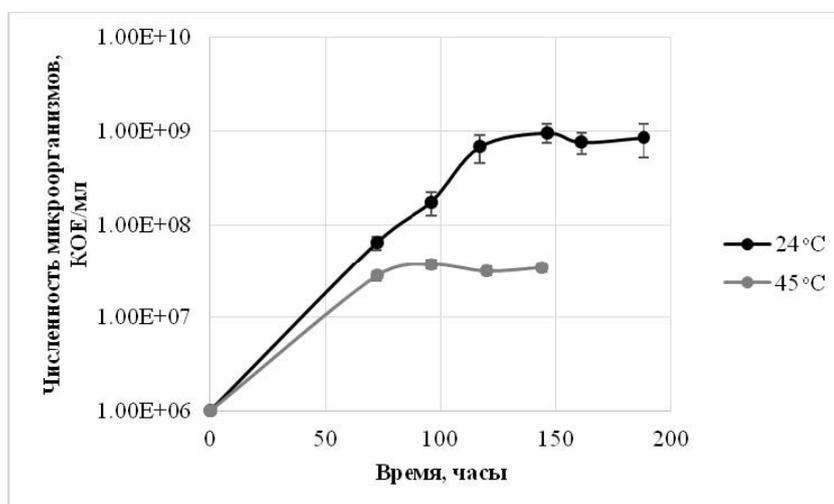
Работа выполнена при поддержке РФФИ мол_а № 18-34-00329

Изучение физиологии роста и экспрессии генов штамма *Gordonia sp. 1D* при культивировании на средах с углеводородами

Ветрова А.А., Делеган Я.А., Позднякова-Филатова И.Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино mewgia@ya.ru

Известно, что представители рода *Gordonia* являются активными деструкторами углеводородов нефти. Термотолерантный штамм *Gordonia sp. 1D* способен к росту на различных алканах с длиной цепи от C8 до C36. Численность микроорганизмов в ходе культивирования при температурах 24°C и 45°C в жидкой минеральной среде в присутствии эйкозана, гексадекана и октана определяли с использованием метода серийных разведений с последующим высевом на богатую агаризованную среду Лурия-Бертани в трех повторах. Физиологическое поведение бактерий при температурах 24°C и 45°C значительно различается. В большинстве случаев при росте на углеводородных субстратах не наблюдается четко выраженной лаг-фазы.



*Рис. 1. Кривая роста штамма *Gordonia sp. 1D* на среде Эванса с эйкозаном при температурах 24°C и 45°C*

Сравнение кривых роста культуры на эйкозане при двух температурах выявило, что численность штамма при 24°C увеличилась на 3 порядка, в то время как при 45°C численность повысилась только на 1,5. Данное явление вероятно связано, с тем что при комнатной температуре агрегатное состояние субстрата твердое, а при температуре 45 °C - жидкое, поскольку температура плавления эйкозана составляет 36°C.

Определение общего уровня транскрипции с промоторов генов алкангидроксилаз было выполнено при помощи обратной транскрипции и ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени. Для этого из клеток *Gordonia sp. 1D*, культивируемых на гексадекане, октане и эйкозанае при температурах 24°C и 45°C, выделяли тотальную РНК. Методом обратной транскрипции, при помощи праймеров комплементарных нуклеотидным последовательностям генов *alkB*, *CYP1* и *CYP2*, была получена кДНК.

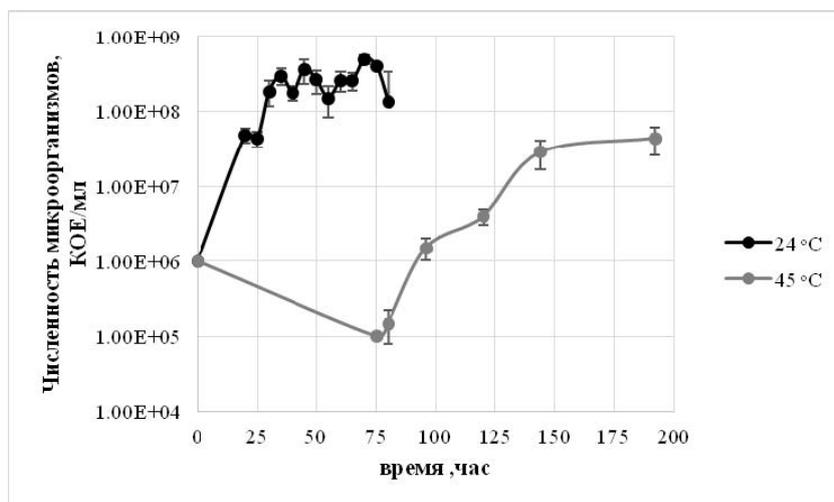


Рис. 2. Кривая роста штамма *Gordonia sp. 1D* на среде Эванса с октаном температурах 24°C и 45°C

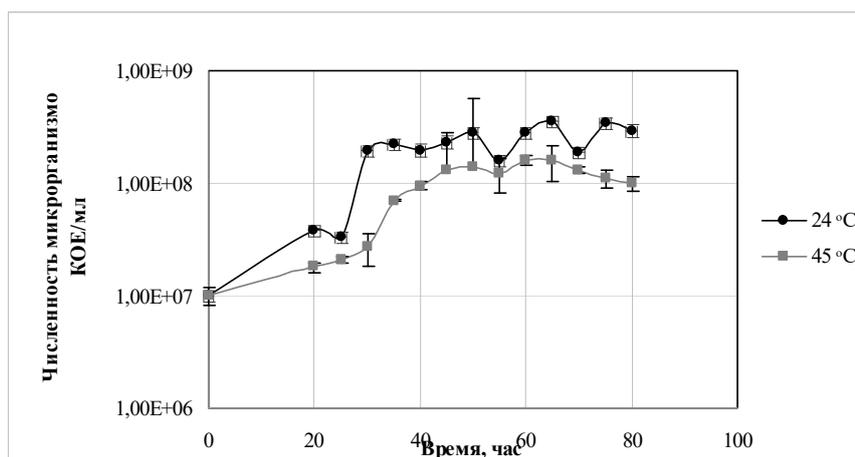


Рис. 3. Кривая роста штамма *Gordonia sp. 1D* на среде Эванса с гексадеканом при температурах 24°C и 45°C

Далее полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения real-time PCR. В качестве контрольного гена выбран ген *16S rRNA*. Уровень мРНК гена *alkB* при росте на гексадекане примерно на два порядка ниже, чем при росте на октане, в то время как уровень мРНК гена *CYP1* при росте в тех же условиях отличается не более чем в два раза. В целом уровень мРНК гена *CYP1* сравним с уровнем мРНК гена *CYP2*, но выше уровня мРНК гена *alkB* более чем на три порядка при росте на гексадекане и более чем на порядок при росте на октане.

Работа выполнена при поддержке РФФИ мол_а № 18-34-00329

Изучение факторов, повышающих стабильность микроорганизмов рода *Pseudomonas* к воздействию экстремальных факторов внешней среды

Ветрова А.А., Якишина Т.Е., Филонов А.Е., Самойленко В.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
phdvetrova@gmail.com

Основой большинства биопрепаратов для очистки территорий и акваторий от нефтяных загрязнений являются живые клетки микроорганизмов, сохранившие высокую активность ферментных систем биодegradации компонентов нефти. Очевидно, что получение биомассы жизнеспособных бактерий (культивирование) является основным этапом получения биопрепарата. От качества полученного биоматериала зависит и эффективность биоремедиации. Следует отметить, что стадия культивирования микроорганизмов – одна из самых затратных: расходы на питательные среды, электроэнергию для биореакторов и т.д. составляют большую часть себестоимости готового биопрепарата.

Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость при хранении, поскольку они склонны к окислению и разложению и в таком виде представляют прекрасную среду для развития посторонней микрофлоры. Это заставляет принимать специальные меры для повышения сохранности препаратов промышленной биотехнологии.

Многие продукты микробного синтеза выпускаются в сухой форме. Это перспективная форма позволяет существенно улучшить товарные показатели – стабильность, удобство транспортировки и использования препарата. Большинство продуктов являются термолабильными, поэтому для каждого конкретного продукта с учетом его характеристики необходимо выбрать соответствующий метод сушки.

Наименьшая инактивация биологических продуктов достигается при использовании сублимационного высушивания, или сушки из замороженного состояния. Биологический объект предварительно замораживают до низких температур – минус 40-70 °С, затем помещают в сушильную камеру и создают там глубокий вакуум и отбирают основную влагу из замороженного состояния, после чего досушивают материал при температуре ниже 40 °С. В ряде случаев к основной субстанции для предотвращения инактивации во время замораживания добавляют криопротекторы.

Одним из критических параметров, определяющих качество бактериальных препаратов, используемых в различных отраслях, является сохранение числа жизнеспособных клеток (КОЕ) в процессе высушивания. Важнейшую роль для успешного решения задачи стабилизации КОЕ является выбор оптимальной композиции защитных сред (криопротекторов). В составе защитных сред основную роль играют две группы веществ: углеводно-белковые структуры, определяющие кристаллическую структуру при замораживании продуктов и группа антиоксидантов.

В качестве модельного микроорганизма был выбран штамм *Pseudomonas putida* BS3701. Было проведено культивирование микроорганизма в ферментере АНКУМ. Масштабирование процесса глубинного культивирования штамма проводили в ферментерах объемом 100 дм³. С целью оптимизации состава криопротекторов были апробированы пять вариантов защитных сред в сравнении с контрольной средой. В качестве антиоксиданта во всех вариантах использовали глутамат натрия в количестве 5%.

Полученную микробную биомассу смешивали с защитной средой в соотношении: на 1 кг биомассы – 1 л защитной среды.

Вариант 1: 10% сухое обезжиренное молоко и 5% глутамат натрия.

Вариант 2: 1,25% сорбит и 1,25% глутамат натрия.

Вариант 3: 5% мальтодекстрин и 5% глутамат натрия.

Вариант 4: 10% сухое обезжиренное молоко + 5% глутамат натрия+ 5% трегалоза.

Вариант 5: 5% мальтодекстрин и 5% глутамат натрия + 5% трегалоза.

Для выбора лучших вариантов были проведены эксперименты по методике «ускоренного хранения». Образцы пяти вариантов сухих бактериальных концентратов с различными композициями криопротекторов выдерживали при высокой температуре – 50°C. Была изучена динамика снижения КОЕ в каждом варианте в течение 3-х суток с отбором проб каждые 12 часов. Минимальный коэффициент инактивации был отмечен для варианта №4. Значение логарифмического коэффициента инактивации составило - 0,047 по сравнению с 0,058 в контроле.

Работа выполнена на базе уникальной научной установки Минобрнауки России – ОТУ ИБФМ РАН, регистрационный номер 279918.

Нетипичная грибная лакказы

Гайдина А.С., Мясоедова Н.М., Черных А.М., Головлева Л.А., Коломыцева М.П.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино
a.s.gaidina@mail.ru

Лакказы – медьсодержащие ферменты, катализирующие восстановление молекулярного кислорода до воды с сопутствующим окислением широкого спектра субстратов фенольной природы: полифенолы, метокси-замещённые фенолы, ароматические амины и т.д. [Baldrian, 2006]. Этот фермент обнаружен у бактерий, грибов, растений и насекомых. Лакказы находят широкое применение в различных отраслях производства: в биоремедиации и очистке сточных вод, обесцвечивании красителей и тканей, биосинтезе фармакологически ценных соединений, создании биосенсоров, тест-систем и т.д. [Baldrian, 2006; Viswanath et al., 2014]. Большинство известных грибных лакказ проявляет свою каталитическую активность в кислой среде [Baldrian, 2006], что ограничивает их применение в различных технологических процессах. Поэтому поиск и характеристика алкалофильных лакказ является актуальной задачей.

В цели настоящей работы входило: оптимизация культивирования гриба *Rhizoctonia solani* для повышения продукции лакказы, активной в нейтрально-щелочной среде, разработка схемы очистки лакказы, получение в гомогенном виде и характеристика физико-химических и молекулярных свойств лакказы.

Культуральную жидкость гриба с лакказной активностью получали посредством погружного культивирования с использованием природных источников углерода и энергии. Выделение и очистку ферментов осуществляли с применением многоэтапной гидрофобной хроматографии на различных носителях, гель-фильтрации и ультрафильтрации. Субъединичную массу белков определяли с помощью SDS-электрофореза в геле по модифицированному методу Лэммли [Eulberg et al., 1997] с окрашиванием белковых полос с помощью красителя Кумасси G-250 [Diezel et al., 1972]. Определение активности лакказы проводили посредством спектрофотометрического метода с использованием АБТК (2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)) в качестве субстрата [Chernykh et al., 2008].

Для оптимизации культивирования гриба с целью повышения лакказной активности в качестве источников углерода и энергии были использованы размельченные зерна гороха, гречихи, фасоли, риса, пшеницы, ржи, кукурузы, ячменя и овса. Лучшими источниками углерода и энергии для достижения максимальной лакказной активности гриба были горох и фасоль. При погруженном культивировании гриба *R. solani* с добавлением семян фасоли в качестве единственного источника углерода и энергии максимальная лакказная активность наблюдалась на третий день, в случае гороха - на 12 день культивирования, при этом, уровень лакказной активности гриба был в 2 раза выше,

чем уровень лакказной активности в присутствии фасоли. Поэтому для получения достаточного объема культуральной жидкости с целью дальнейшего выделения и характеристики лакказы использовали размельченные зерна гороха.

В результате очистки был получен электрофоретически гомогенный белок с удельной лакказной активностью, превышающей активность исходной культуральной жидкости в 50,5 раз. Молекулярная масса выделенного фермента, определённая при помощи методов гель-фильтрации и SDS-электрофореза составила около 70 кДа. Лакказа, выделенная из гриба *R. solani* была наиболее активна с типичными лакказными субстратами в нейтральных условиях среды (рН 7,0 – 8,0).

С помощью масс-спектрометрии идентифицированы продукты трансформации ароматических субстратов выделенной лакказой гриба *R. solani*. Показана способность лакказы осуществлять каталитическое окисление, декарбоксилирование, деметоксилирование и полимеризацию, что особенно актуально для ряда биотехнологических процессов: деградации и трансформации ксенобиотиков, в клеточных технологиях получения биологически активных и фармакологически ценных соединений, создании биосенсоров и т.д.

В результате анализа определенной в ходе работы полной последовательности геномной ДНК гриба *R. solani* и полученных данных MALDI-TOF анализа выделенной лакказы впервые идентифицирована последовательность гена, кодирующего исследуемый фермент. Осуществлен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных генов лакказ грибов рода *Rhizoctonia* и полученной последовательности лакказы *R. solani*.

Проведено гомологическое моделирование пространственной структуры лакказы гриба *R. solani*. В настоящее время осуществляется сравнительный структурный анализ полученной модели лакказы и лакказ с известной структурой, что поможет выявить структурные детерминанты, определяющие необычные свойства выделенной лакказы.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение №14.616.21.0001, RFMEFI61614X0001).

Литература

1. Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties //FEMS Microbiology Reviews. – 2006. – Т. 30. – С. 215-242.
2. Chernykh A. M., Myasoedova N. M., Kolomytseva M. P., Ferraroni M., Scozzafava A., Briganti F., Golovleva L. A. Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steherinum ochraceum* strain 1833 //J Appl Microbiol. – 2008. – Т. 105. – С. 2065-2075.
3. Diezel W., Kopperschläger G., Hofmann E. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue //Analytical biochemistry. – 1972. – Т. 48. – С. 617-620.
3. Eulberg D., Golovleva L.A., Schlömann M. 1997. Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. J. Bacteriol., V.179, N2, pp. 370-381.
4. Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A. P., Narasimha G. Fungal laccases and their applications in bioremediation //Enzyme research. – 2014. – С. 163242.

***Paracoccus yevei* – изолят из зеленого чая**

Доронина Н. В., Капарулина Е. Н.

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

Многие аэробные метилотрофные бактерии (метилотрофы) являются фитосимбионтами, реализующими разные стратегии положительного влияния на рост растений (Доронина с соавт., 2015). Зимой при отрицательных температурах они локализуются внутри растительных тканей, летом - активно развиваются на листовой поверхности или переживают засушливый период, иммобилизованные на сухих растениях. Метанол – естественный продукт метаболизма растений - служит источником углерода и энергии для метилотрофов, которые легко выделить на этом субстрате из растительного материала. Метилотрофы выделяются из сырых растений, семян и высушенных растительных тканей. Из образца сухого зеленого чая *Camellia sinensis* (L.) нами выделен в чистую культуру на среде с метанолом штамм Теа.

Цель данной работы – идентификация метилотрофа штамм Теа.

Штамм Теа представлен граммотрицательными, неспорообразующими, неподвижными кокковидными клетками, размножающимися бинарным делением (рис.1).

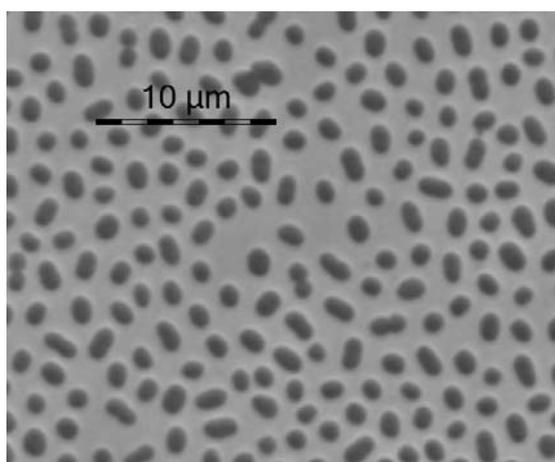


Рис. 1. Морфология клеток штамма Теа, выращенных на метаноле (фазовый контраст клеток, длина масштабной метки 10 мкм)

Является аэробом, факультативным метилотрофом, наряду с метанолом использует широкий спектр полиуглеродных субстратов, хорошо растет на средах с пептоном. Нейтрофил, оптимально растет при 29-37°C. Оксидазо-, уреазоположителен. Восстанавливает нитраты и образует кислоту из глюкозы. В отличие от метилотрофов - фитосимбионтов не синтезирует индол из триптофана.

Секвенирование гена 16S рРНК выявило принадлежность нового изолята Теа к *Paracoccus yeeii* CDCG112^T (CCUG 46822) – 99.9% сходства (рис.2). *Paracoccus yeeii* CDCG112^T выделен ранее из клинической пробы человека с перитонитом (Daneshwar et al., 2003). Этот же вид паракокков обнаружен у других больных перитонитом в разных клиниках США и Канады. Выделенный нами штамм Теа, по-видимому, попал на растения с рук сборщиков чая. Установлено, что штамм Теа погибает немедленно в жидкой среде при 90°C, однако сохраняет жизнеспособность при 70 °C в течение 3-5 мин. Это следует учитывать при заваривании зеленого чая.

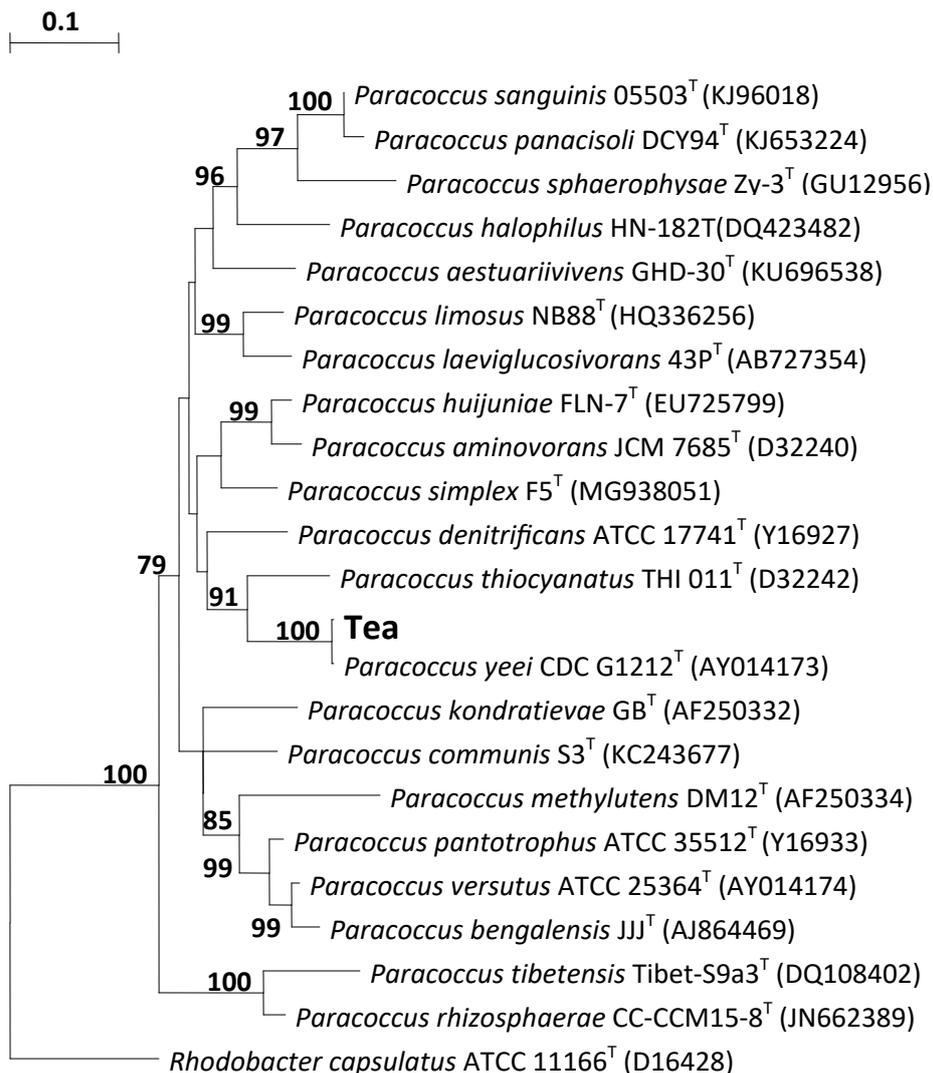


Рис.2. Филогенетическое положение штамма Tea, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166^T (D16428) в качестве внешней группы.

Литература

1. Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. Аэробные метиловобактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 2. С. 111-121.
2. Daneshvar M.I., Hollis D.G., Weyant R.S., Steigerwalt A.G., Whitney A.M., Douglas M.P., Macgregor J.P., Jordan J.G., Mayer L.W., Rassouli S.M., Barchet W., Munro C., Shuttleworth L. & Bernard K.: *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. J. Clin. Microbiol., 2003, V.41, P.1289-1294.

Благодарим к.б.н. Т.Н. Абашину (лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН) за проведение световой микроскопии.

Характеристика глюкозо-1 дегидрогеназ у нерастающих на сахарах метанотрофных бактерий

Егорова С.В., Бут С.Ю., Мустахимов И.И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушино mii80@rambler.ru

Метанотрофы – специализированная группа аэробных бактерий, использующих метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Хотя все известные метанотрофы не способны расти на сахарах, большинство видов метанотрофов имеют глюкокиназу, катализирующую вовлечение свободной внутриклеточной глюкозы в центральный метаболизм. Ранее нами показано, что у облигатного метанотрофа *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z глюкокиназа играет ключевую роль в накоплении запасных питательных веществ – сахарозы и гликогена, а также влияет на скорость роста культуры (Mustakhimov et al., 2017). Анализ депонированных геномов бактерий выявил наличие у некоторых метанотрофов генов, предположительно кодирующих ферменты окисления глюкозы до 6-фосфоглюконата (глюкозодегидрогеназу, глюконолактоназу и глюконаткиназу), что указывает на функционирование у метанотрофов двух параллельных и ранее не изученных путей утилизации глюкозы.

Цель работы – получение и биохимическая характеристика рекомбинантных глюкозо-1-дегидрогеназ у метанотрофов – галоалкалотолерантного *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z и нейтрофильного негалофильного *Methylobacter luteus*.

Гены, кодирующие глюкозо-1-дегидрогеназу, были амплифицированы с геномной ДНК *Mm. alcaliphilum* 20Z и *M. luteus*, клонированы в плазмиде pET22b и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. Методом Ni-NTA аффинной хроматографии были получены электрофоретически чистые препараты ферментов. Показано, что рекомбинантные глюкозо-1-дегидрогеназы *Mm. alcaliphilum* 20Z и *M. luteus* – гомодимеры (молекулярная масса субъединицы 20 кДа) с удельной активностью 39,3 и 30,5 Е/мг белка при оптимальных значениях pH (pH 10 и pH 8,5, соответственно). Оба белка специфичны к глюкозе и ингибируются в присутствии глюкозо-6-фосфата – продукта реакции фосфорилирования глюкозы катализируемой глюкокиназой, что свидетельствует о тесной связи у метанотрофов двух путей метаболизма глюкозы. АТФ, АДФ, НАДН и НАДФН не влияли на активность ферментов. Активность изучаемых ферментов уменьшалась с увеличением температуры (оптимум при 20 °С), однако глюкозо-1-дегидрогеназа *M. luteus* сохраняла 57% активности при 50 °С, тогда как остаточная активность белка *Mm. alcaliphilum* 20Z в тех же условиях составляла 13%. Увеличение концентрации NaCl в реакции до 2 М также приводило к снижению активности глюкозо-1-дегидрогеназ *M. luteus* и *Mm. alcaliphilum* 20Z до 39 и 12,7% остаточной активности, соответственно.

Проведенный Blast анализ показал наличие глюкозо-1-дегидрогеназы не только у *M. luteus* и *Mm. alcaliphilum* 20Z, но также у *Methylomicrobium buryatense* 5G, *Methylobacter whittenburyi* и *Methylobacter marinus* с высокой гомологией аминокислотных последовательностей фермента (~80% идентичности). Кроме того, у данных метанотрофов обнаружены гены, гомологичные генам глюконаткиназы и глюконолактоназы гетеротрофов. У *M. luteus*, *M. whittenburyi* и *M. marinus* гены глюкозодегидрогеназы, глюконолактоназы и глюконаткиназы располагаются в одном кластере, тогда как у *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Mm. buryatense* 5G ген глюкозодегидрогеназы локализован отдельно от генов глюконолактоназы и глюконаткиназы.

Таким образом, нами показано, что у метанотрофов образуемая внутри клеток глюкоза окисляется до 6-фосфоглюконата не только через глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконо-лактон, но также через D-глюконо-1,5-лактон и глюконат. 6-фосфоглюконат далее поступает в окислительный пентозофосфатный цикл с получением

энергии, но потерей С–С связи, или распадается до С3 метаболитов в пути Энтнера-Дудорова. Функционирование у не растущих на сахарах метанотрофов двух путей вовлечения внутриклеточной глюкозы в центральный метаболизм с одной стороны свидетельствует об их высокой метаболической гибкости, с другой представляется избыточной и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00728-а.

Литература

1. But SY, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Mustakhimov II, Kalyuzhnaya MG, Trotsenko YA. *Sucrose metabolism in halotolerant methanotroph Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. // Arch Microbiol. 2015, 197(3):471-80.
2. Mustakhimov II, Rozova ON, Solntseva NP, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Trotsenko YA. The properties and potential metabolic role of glucokinase in halotolerant obligate methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2017, 110(3):375-386.

Сравнительная характеристика ключевых ферментов серинового цикла у метанотрофов реализующих различные пути С1-ассимиляции

С. В. Егорова¹, С. Ю. Бут¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пущино,
bohemiahrhapsody12345@gmail.com

Метанотрофы - специализированная группа бактерий, использующих метан или метанол в качестве единственных источников углерода и энергии. Метанотрофы получают энергию, окисляя С1-субстрат до углекислого газа и ассимилируют углерод на уровне формальдегида, формиата и/или СО₂ посредством трех биохимических путей - серинового, рибулозомонофосфатного (РМФ) или рибулозобисфосфатного (РБФ). Сериновый путь начинается реакцией конденсации формальдегида (в форме оксиметилтетрагидрофолата) и глицина с образованием серина, из которого далее в реакции переаминирования с глиоксилатом, катализируемой серин-глиоксилат аминотрансферазой (Sga), образуется гидроксипируват. Восстановление гидроксипирувата в глицерат катализируется гидроксипируватредуктазой (Hpr), причем высокая активность этого фермента служит индикатором функционирования серинового пути. Несмотря на интенсивные исследования С1 метаболизма в бактериях, роль серинового цикла в метанотрофах изучена слабо. Анализ секвенированных геномов показывает присутствие генов, кодирующих ферменты серинового пути у большинства метанотрофов и не растущих на метане метиловых бактерий, включая штаммы, ассимилирующие углерод главным образом через рибулозомонофосфатный путь и/или цикл Кальвина. При этом роль серинового цикла у метанотрофов I и X типов остается невыясненной.

Цель исследования: определение функций и роли серинового цикла у метанотрофных бактерий, реализующих различные пути ассимиляции формальдегида.

Гены гидроксипируватредуктазы и серин-глиоксилат аминотрансферазы были обнаружены во всех доступных геномах метанотрофных бактерий, за исключением представителей филума *Verrucomicrobia*, реализующих РБФ-путь. В хромосомах этих штаммов гены гидроксипируватредуктазы и серин-глиоксилат аминотрансферазы расположены в кластерах генов, кодирующих другие ферменты серинового цикла.

Филогенетический анализ показывает, что Sga и Hrg метилотрофных бактерий разделяются на две группы, причем ферменты метанотрофов, реализующих, помимо серинового пути, РМФ-цикл и цикл Кальвина, относятся к одной из них, а ферменты метанотрофных бактерий и не растущих на метане метиловых бактерий, реализующих сериновый цикл в качестве единственного пути ассимиляции C1-соединений – к другой. Данный факт подразумевает различное происхождение ферментов серинового пути у бактерий, составляющих разные группы и, по-видимому, их различные функции.

Клонированием и гетерологической экспрессией в *E. coli* нами были получены рекомбинантные препараты серин-глиоксилат аминотрансфераз и гидроксипируватредуктаз из *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z (метанотроф I типа), *Methylosinus trichosporium* OB3b (метанотроф II типа) и *Methylococcus capsulatus* Bath (метанотроф X типа) и изучены их биохимические свойства.

Sga изучаемых метанотрофов демонстрировала схожие свойства и имела самую высокую каталитическую эффективность в реакции между глиоксилатом и серином, что соответствует ее функции для обеспечения циркуляции пути ассимиляции серина. Поэтому можно предположить, что серин-глиоксилат аминотрансфераза не является точкой для регуляции серинового цикла в метанотрофах, относящихся к разным типам.

В тоже время, кинетические параметры Hrg штаммов 20Z, OB3b, дают основания полагать, что регуляция серинового цикла происходит на уровне активности именно этого фермента. Все три фермента катализировали НАД(Ф)Н-зависимое восстановление гидроксипирувата, а также глиоксилата, но не обратные реакции окисления глицерата или гликолата. Активность и сродство к основному субстрату у гидроксипируватредуктазы из *Ms. trichosporium* OB3b были значительно выше, чем у двух других ферментов, а также слабее ингибировалась гидроксипируватом. Это согласуется с тем фактом, что у метанотрофов II типа сериновый цикл является единственным путем ассимиляции углерода метана. В то же время ферменты из *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Ms. capsulatus* Bath демонстрируют примерно одинаковую каталитическую активность для обоих субстратов.

Логично полагать, что основной физиологической ролью Hrg у метанотрофов II типа является восстановление гидроксипирувата, в то время как у метанотрофов I и X типов Hrg может также выступать в качестве глиоксилатредуктазы, причем соотношение этих двух реакций регулируется соотношением концентраций НАДН₂ и НАДФН₂ в клетке.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-11113

Влияние промотора гена метанолдегидрогеназы на светимость аэробных метилотрофных бактерий, меченных зеленым флуоресцентным белком

Екимова Г.А., Агафонова Н.В., Фирсова Ю.Е.

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

Аэробные метилотрофные бактерии широко распространены в природе и тесно ассоциированы с растениями. Фитосимбиоз метиловых бактерий обусловлен, с одной стороны тем, что растения выделяют метанол и другие C₁-соединения, используемые метиловыми бактериями в качестве источников углерода и энергии. С другой стороны, метилотрофы стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов (ауксинов, цитокининов), витамина B₁₂, а также за счет активности фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы и азотфиксации. Одним из наиболее удобных методов исследования бактерий *in vivo* является мечение их зеленым флуоресцентным белком (GFP). Данный подход позволяет провести прямой подсчет численности бактерий на поверхности и внутри тканей растений, а также может

использоваться при исследовании конкурентной колонизации растений двумя штаммами одновременно. Несмотря на интенсивные исследования фитосимбиоза метилотрофов сведения о GFP-меченных штаммах метилотрофов ограничиваются видом *Methylobacterium extorquens* (в настоящее время реклассифицирован в новый род *Methylorubrum*).

Объектами исследования служили штаммы аэробных метиловобактерий *Methylorubrum extorquens* AM1, *Methylobacterium nodulans* ORS2060 и *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831. Одним из критериев отбора являлся тот факт, что все штаммы являются модельными метилотрофами для которых получена полная последовательность генома. Кроме того, *Mr. extorquens* и *Mb. radiotolerans* являются наиболее распространенными видами метиловобактерий на поверхности листьев растений, а *Mb. nodulans* – единственным из метилотрофов истинным фитосимбионтом, образующим клубеньки.

Для получения GFP-меченных штаммов наиболее удобно использовать искусственные опероны, содержащие ген *gfp* под контролем сильного промотора, введенных в клетки бактерий в составе плазмид или хромосому бактерий за счет рекомбинации. В настоящий момент имеется система экспрессионных векторов для метилотрофов на основе сильного промотора гена метанолдегидрогеназы (P_{mxhF}) из *Mr. extorquens* (Marx and Lidstrom, 2001). Однако данная система тестировалась только у близкородственных представителей рода: *Mb. extorquens*, *Mb. dichloromethanicum*, *Mb. chloromethanicum*, которые, как известно в настоящее время, относятся к одному виду *Mr. extorquens*, и, следовательно, имеют практически идентичные последовательности P_{mxhF} . Выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторно-операторных областей генов метанолдегидрогеназы у метиловобактерий выявило значительные отличия последовательности P_{mxhF} *Mb. radiotolerans* и, в особенности, *Mb. nodulans* от таковой промотора *Mr. extorquens*. Например, несмотря на то, что область -35 консервативна у метилотрофов, область -10 имеет значительные различия у разных видов, что может привести к низкой активности промотора из *Mr. extorquens* в клетках других видов (рис. 1).



Рис. 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторов генов *mxhF* у различных метиловобактерий: *Mr. extorquens* AM1 и PA1; *Mb. radiotolerans* JCM2831 и *Mb. nodulans* ORS2060

Для проверки этой гипотезы на основе плазмиды pCM160 (Marx and Lidstrom, 2001) были получены векторы p7A-29 и p7A-34, содержащие вместо промотора P_{mxhF} из *Mr. extorquens* промоторы из *Mb. radiotolerans* и *Mb. nodulans* соответственно. Затем в полученных векторах был клонирован ген *gfp* из плазмиды pGreenTIR (Miller, Lindow, 1997), что дало векторы pCM160gfp, p7A-29gfp, p7A-34gfp. На графике (рис. 2) приведены данные о светимости штаммов, экспрессирующих GFP, ген которого введен на различных векторах. Видно, что промотор P_{mxhF} из *Mr. extorquens* обеспечивает наименьшую экспрессию флуоресцентного белка, по сравнению с гомологичными промоторами.

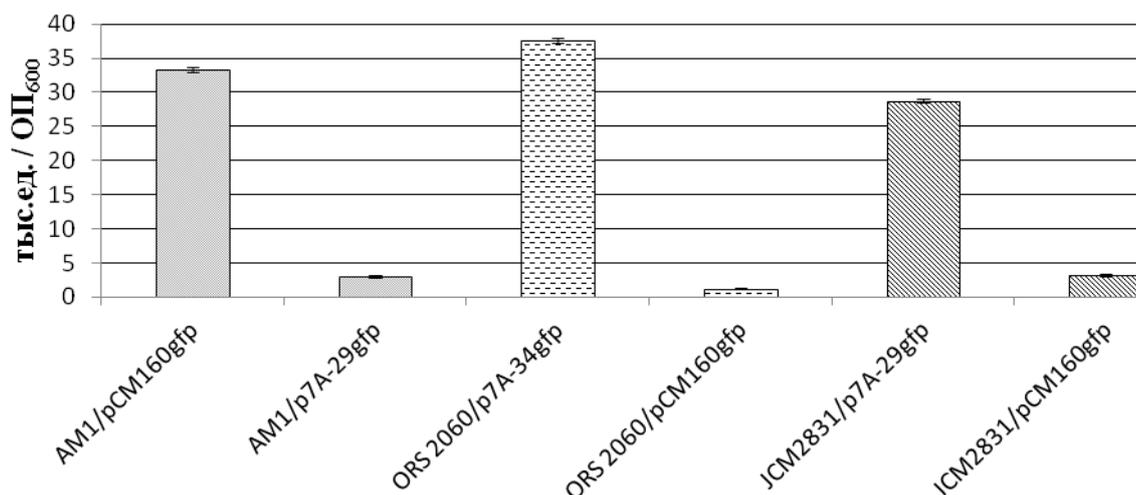


Рис. 2 Флуоресценция клеток трансформантов *Mr. extorquens* AM1, *Mb. radiotolerans* JCM2831 и *Mb. nodulans* ORS2060, несущих плазмиды, содержащие ген *gfp* под контролем разных промоторов гена метанолдегидрогеназы

Таким образом, в результате работы обнаружены различия в структуре промоторов метанолдегидрогеназы разных видов аэробных метилотрофных бактерий. Показано, что активности промоторов в клетках метиловых бактерий являются наибольшими с использованием гомологичных промоторов. Получены векторы для экспрессии белков в *Mb. radiotolerans* JCM2831 и *Mb. nodulans* ORS2060.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-34-00998 мол_а.

Литература

1. Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // Microbiology (UK). 2001. V. 147. P. 2065-2075.
2. Miller W.G., Lindow S.E. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions // Gene. 1997. V. 191. № 2. P. 149-153.

Выявление генов и филогенетический анализ ферментов катаболизма 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина у представителей родов *Methylobacterium* и *Methylorubrum*

Екимова Г.А., Доронина Н.В.

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

Аэробные метилотрофные бактерии – обширная группа метилотрофных прокариот, использующих окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. Помимо важной роли в глобальных циклах углерода, многие аэробные метилотрофные бактерии являются симбионтами растений и стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов и витаминов. При росте на поверхности и внутри тканей растений метилотрофы могут использовать в качестве источников питания различные метаболиты растений, такие как аминокислоты. Особую роль в фитосимбиозе занимает деградация бактериями 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) – предшественника в биосинтезе этилена растениями.

Этилен – один из основных фитогормонов, он играет важную роль в развитии корневой системы, созревании плодов, а также в передаче стрессового сигнала. В неблагоприятных условиях, таких как температурный, солевой и другие стрессы, концентрация этилена в тканях растений увеличивается. Как часть стрессовой реакции он ингибирует удлинение корня, нодуляцию и транспорт ауксинов, ускоряет старение тканей и вызывает дефолиацию. Бактерии, обладающие ферментом АЦК-дезаминазой, который деградирует АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония, способствуют снижению концентрации этилена и повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.

Эффективным методом оценки способности бактерий к фитосимбиозу является поиск генов, продукты которых могут стимулировать рост растений, с помощью ПЦР с вырожденными праймерами. В случае гена АЦК-дезаминазы (*acdS*) такой анализ осложняется присутствием в геномах некоторых бактерий гена, кодирующего D-цистеиндесульфгидразу (*dcyD*), фермент, аминокислотная последовательность которого характеризуется высоким уровнем идентичности с последовательностью АЦК-дезаминазы. D-цистеиндесульфгидраза катализирует деградацию D-цистеина до пирувата, сероводорода и аммиака. Активность этого фермента определяет устойчивость бактерий к токсичному для них D-цистеину, а выделяющийся при его деградации сероводород обладает фунгицидными свойствами и по последним данным регулирует множество физиологических процессов у растений.

Цель работы – разработка системы праймеров для амплификации генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфгидразы и анализ их распространения среди аэробных метилотрофных бактерий родов *Methylobacterium* и *Methylorubrum*. На основе нуклеотидных последовательностей генов *acdS* и *dcyD* различных видов бактерий, представленных в GenBank, разработаны наборы вырожденных олигонуклеотидных праймеров. Филогенетический анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили методами Neighbor-Joining/UPGMA, реализованными в программе MEGA6.

Аминокислотные последовательности АЦК-дезаминаз метиловых бактерий проявляют очень высокий уровень идентичности между собой – от 86%. Однако, можно выделить несколько групп, первую из которых образуют белки AcdS из *Methylobacterium nodulans* ORS2060 и *Methylobacterium* sp. 4-46 совместно с АЦК-дезаминазами различных ризобий, т. к. эти штаммы близки по своим свойствам к ризобиям и являются настоящими клубеньковыми симбионтами бобовых растений. Тем не менее, согласно филогенетическому дереву, построенному по последовательностям гена 16S рРНК, эти виды обособлены в кластере с *Methylobacterium isbiliense*. Вторую группу последовательностей белков составляют AcdS из следующих представителей рода *Methylobacterium*: *Mb. variabile*, *Mb. platani*, *Mb. aquaticum* и *Mb. tarhaniae*, которые также образуют единый кластер на дереве, построенном по гену 16S рРНК. В третью группу объединены последовательности AcdS близкородственных видов *Mb. fujisawaense*, *Mb. oryzae*, *Mb. phyllosphaerae*, *Mb. phyllostachyos*, *Mb. radiotolerans*, *Mb. longum*, *Mb. brachiatum*, *Mb. mesophilicum*, *Mb. tardum*, *Mb. pseudosasicola*. Исключением из этой группы можно считать *Mb. gregans*, который, несмотря на присутствие гена *acdS*, похожего на таковой у представителей этой группы, филогенетически достаточно удален от нее.

Филогенетический анализ белков AcdS и гена 16S рРНК выявил, что, как минимум, две группы *Methylobacterium* – разделились и унаследовали от общего предка ген АЦК-дезаминазы, что коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК. Наличие генов *acdS* у двух достаточно обширных групп метиловых бактерий может свидетельствовать об эволюционной адаптации к их тесной ассоциации с растениями.

На филогенетическом дереве D-цистеиндесульфгидраз можно выделить большую группу, объединяющий белки представителей рода *Methylobacterium*, которые недавно

были реклассифицированы в новый род *Methylorubrum*. Она включает виды *Mr. salsuginis*, *Mr. suomiense*, *Mr. zatmanii*, *Mr. populi*, *Mr. thycyanatum*, *Mr. aminovorans*, *Mr. rhodesianum*, *Mr. extorquens*, образующие также отдельную группу на дереве, построенном по последовательности гена 16S рРНК.

За исключением *Methylobacterium phyllostachyos* и *Methylobacterium pseudosasicola*, в геномах некоторых метиловых бактерий присутствует ген *dcyD*, а *acdS* отсутствует. Важно отметить, что активность АЦК-дезаминазы и эмиссия сероводорода приводят к одинаковому эффекту – повышению устойчивости растений к стрессу. Поэтому, вероятно, бактерии приспособились использовать эти два близкородственных фермента для адаптации к жизни в ассоциации с растениями. Можно предположить, что виды, обладающие АЦК-дезаминазной активностью, теснее связаны с растениями, проникая внутрь тканей и используя помимо метанола доступные аминокислоты. Напротив, виды, несущие ген D-цистеиндесульфогидазы, обитают на поверхности растений и в основном потребляют метанол и другие C₁-соединения. Однако подтверждение этого предположения требует дальнейших исследований.

Таким образом, в результате ПЦР-скрининга с помощью вырожденных олигонуклеотидных праймеров 28 штаммов аэробных метиловых бактерий гены АЦК-дезаминаз (*acdS*) обнаружены у типовых штаммов видов рода *Methylobacterium*: *Mb. brachiatum*, *Mb. fujisawaense*, *Mb. goesingense*, *Mb. gregans*, *Mb. longum*, *Mb. marchantiae*, *Mb. phyllosphaerae*, *Mb. tardum*, гены D-цистеиндесульфогидаз (*dcyD*) – у *Mb. gnaphalii*, *Mb. gossipiicola*, *Mb. trifolii*, а также *Mr. aminovorans*, *Mr. rhodesianum*, *Mr. salsuginis*, *Mr. suomiense*, *Mr. thycyanatum*, *Mr. zatmanii*. Анализ секвенированных и представленных в GenBank аминокислотных последовательностей *AcdS* и *DcyD* метиловых бактерий выявил, что из 48 видов рода *Methylobacterium* (11 из которых отнесены к новому роду *Methylorubrum*) в геноме 29 присутствуют гены *acdS* и *dcyD*. Ген *acdS* обнаружен у 18 видов, *dcyD* – у 13, при этом два вида обладают обоими генами. Филогенетический анализ показал, что аминокислотные последовательности *AcdS* образуют два кластера, а аминокислотные последовательности *DcyD* – один, что коррелирует с филогенией гена 16S рРНК соответствующих видов. Система ПЦР-детекции генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидазы позволит проводить анализ новых изолятов, расширив тем самым спектр метилотрофов-фитосимбионтов, и реализовать их биотехнологический потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-04-00381_a.

Идентификация генов катаболизма *epsilon*-капролактама, локализованных на CAP плазмиде pBS270

Есикова Т.З.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, das3534@rambler.ru

Капролактамы (*epsilon*-капролактамы, циклический амид 6-аминогексановой кислоты, КАП) – синтетическое соединение, используется в качестве сырья для производства полимерных материалов (поликапроамид, капрон, нейлон-6), которые находят широкое применение в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве, медицине и быту. Вместе с тем, КАП и отходы его производства являются токсичными соединениями, которые вызывают дерматиты и судороги у людей, ингибируют рост растений и микроорганизмов, играющих важную роль в поддержании экологического равновесия почв (Вахі, 2013). Из-за токсического воздействия на живые организмы данный поллютант представляет опасность для окружающей среды и здоровья человека. Этим

обстоятельством и объясняется интерес к изучению микробиологических и генетических аспектов катаболизма КАП.

К настоящему времени описаны бактерии-деструкторы КАП, принадлежащие к различным таксономическим группам - протеобактериям, актинобактериям и споровым. Однако ключевые гены и ферменты катаболизма КАП до сих пор не идентифицированы и не охарактеризованы. Получение информации об этом ферментном комплексе и организации генетических систем катаболизма КАП имеет несомненную актуальность и новизну.

Ранее нами было показано, что способность бактерий рода *Pseudomonas* утилизировать КАП детерминируется плазмидами биодеградации (САР плазмидами), которые содержат генетическую информацию, необходимую для полной минерализации ксенобиотика (Esikova et al., 2012). Цель работы – идентификация генов, детерминирующих катаболизм капролактама, локализованных на САР плазмиде pBS270.

Для клонирования фрагментов плазмиды pBS270 (Inc P-7, 110 т.п.н.) использовали специально созданный вектор pFME5mini (2.6 т.п.н) - мини-репликон природной плазмиды pFME5, выделенной из штамма *P. fluorescens* FME5. Данный вектор обеспечивал репликацию и поддержание генетических конструкций в клетках псевдомонад. ДНК pBS270 и pFME5mini обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI, смесь фрагментов ДНК лигировали T4 ДНК-лигазой и трансформировали клетки штамма *P. putida* KT2442, не способного утилизировать КАП и его интермедиаты. Селекцию трансформантов проводили на минеральной среде с КАП в качестве единственного источника углерода и энергии. В результате были получены колонии штамма *P. putida* KT2442, содержащие pFME5mini со «вставкой» размером около 15 т.п.н. Штамм был обозначен как *P. putida* KT2442(pTE270-15).

Секвенирование и анализ клонированного фрагмента позволили идентифицировать в его составе кластер из 6 генов (*dcaKAREHF*), порядок расположения которых аналогичен структуре *dca*-оперона (от dicarboxylic acid) в геноме штамма *Acinetobacter* sp. ADP1. Известно, что ферменты, кодируемые этими генами, участвуют в окислении высших дикарбоновых кислот, представителем которых является адипиновая кислота (АД) - ключевой интермедиат катаболизма КАП (Parke et al., 2001). Также в составе клонированного фрагмента были идентифицированы гены, продукты которых имеют высокий уровень сходства с белками *CaiB/BaiF*, *EtfA* и *EtfB* штамма *P. putida* SJ3 (94, 87 и 91% гомологии аминокислотных последовательностей, соответственно) и *FixC* бактерии *P. taiwanensis* SJ9 (94% гомологии). По литературным данным, эти ферменты и белковые продукты-акцепторы, участвуют в переносе электронов в окислительно-восстановительных реакциях, сопряженных с метаболизмом дикарбоновых кислот (Watmough et al., 2010).

Сравнительное изучение динамики роста штаммов *P. putida* KT2442(pBS270) и *P. putida* KT2442(pTE270-15) в жидких минеральных средах с КАП и АД в качестве единственных источников углерода показало, что обе плазмиды обеспечивали сходный рост клеток на адипинате. Однако рост штамма *P. putida* KT2442(pTE270-15) на среде с КАП характеризовался более длительным лаг-периодом по сравнению с *P. putida* KT2442(pBS270). Тем не менее, наличие генов, содержащихся в составе клонированного фрагмента, является достаточным условием для окисления бактериями *Pseudomonas* не только адипината, но и капролактама.

Для дальнейших исследований фрагмент плазмиды pTE270-15, содержащий только кластер *dca*-генов (*dcaKAREHF*), был реклонирован в *Escherichia-Pseudomonas* шаттл-вектор pUCP22 и с помощью трансформации получен штамм *P. putida* KT2442(pTE-dca108). Параметры роста данного штамма на среде с АД были сравнимы с таковыми для *P. putida* KT2442, содержащего исходную плазмиду pBS270 или pTE270-15. Однако штамм *P. putida* KT2442(pTE-dca108), в отличие от *P. putida* KT2442(pBS270) и *P. putida*

KT2442(pTE270-15), потерял способность утилизировать КАП. Поскольку помимо *dca*-оперона плазмиды pTE270-15 содержит также гены *caiB/baiF*, *etfβ*, *etfA* и *fixC/etf-QO*, то с высокой долей вероятности можно предположить их участие в детерминировании реакций окисления КАП.

По имеющимся данным, дальнейшее расщепление аминокaproновой кислоты, образующейся в результате гидролиза КАП, опосредовано глутамат дегидрогеназным шунтовым механизмом. Его роль может быть особенно существенной, когда КАП является единственным источником углерода, азота и энергии. В этом случае глутамат дегидрогеназный шунт необходим для обеспечения как потребностей энергетического обмена микроорганизмов-деструкторов, связанных с поступлением азотсодержащего субстрата в традиционное русло окисления дикарбоновых кислот (АД), так и потребностей конструктивного обмена. Предположительно, ферменты и белковые продукты-акцепторы генов *caiB/baiF*, *etfβ*, *etfA* и *fixC/etf-QO* вовлечены в окислительно-восстановительные реакции, связанные с функционированием глутамат дегидрогеназного шунта. Что касается генов, кодирующих синтез капролактама гидролазы и аминокaproнат трансминазы (названия условные), то в составе клонированного фрагмента pBS270 они не были идентифицированы и, вероятно, локализованы на других участках плазмиды. Полученные результаты являются первыми сведениями об организации генов, вовлеченных в катаболизм капролактама и локализованных на CAP плазмиде.

Литература

1. Baxi NN (2013) Influence of ϵ -caprolactam on growth and physiology of environmental bacteria. *Ann Microbiol* 63:1471-1476
2. Esikova TZ, Ponamoreva ON, Baskunov BP, Taran SA, Boronin AM (2012) Transformation of low-molecular linear caprolactam oligomers by caprolactam-degrading bacteria. *J. Chem Technol Biotechnol* 87:1284-1290
3. Parke D, Garcia MF, Ornston LN (2001) Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for β -oxidation of straight_chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl Environ Microbiol* 67:4817-4827
4. Watmough H, Frermen FE (2010) The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone xidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1797:1910-1916

Биодеградация грибами образцов поликапролактона и полилактида

¹ Желифонова В.П., ¹ Антипова Т.В., ¹ Зайцев К.В., ² Недорезова Р.М., ³ Аладышев А.М.,
³ Клямкина А.Н., ³ Костюк С.В., ⁴ Данилогорская А.А., ¹ Козловский А.Г.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
г. Пущино, tantipova@ibpm.pushchino.ru

²Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический
факультет, г. Москва

³Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва

⁴Научно исследовательский институт физико-химических проблем, г. Минск

В настоящее время при исследовании полимеров приоритет имеют материалы, производимые из возобновляемого сырья и подвергающиеся деградации в окружающей среде. Примерами таких соединений являются разнообразные полимеры на основе поли- ϵ -капролактона (PCL) или полилактида (PLA). Эти полимеры благодаря их физико-химическим свойствам (биоразлагаемость, прочность, эластичность и др.) нашли широкое применение в биомедицине, производстве упаковки, в моделировании и др.

Микроорганизмы, разрушающие PCL и PLA в естественных местообитаниях, отличаются биоразнообразием. Они способны деградировать полимеры с помощью различных гидролитических ферментов, которые осуществляют разрыв цепи полимера до растворимых в воде низкомолекулярных олигомеров, димеров, мономеров и минерализовывать их. Однако физико-химические свойства полимеров (площадь поверхности, гидрофильные и гидрофобные свойства, молекулярный вес, полидисперсность, кристалличность и др.) играют важную роль в процессах биодеградации [1].

Цель данного исследования – отбор активных агентов биодеградации новых образцов PCL, PLA, а также пленок полипропилена, модифицированных DL-PLA среди мезофильных грибов из различных таксонов.

Образцы полиэфигов были получены при раскрытии цикла *L*-лактида или ϵ -капролактона в присутствии каталитических количеств комплексов алюминия [2]. Пленки полипропилена, содержащие около 5 мас.% DL-полилактида (PP1 и PP2), получали полимеризацией пропилен в среде жидкого мономера, в присутствии DL-PLA по методам описанным ранее [3].

Поиск агентов биодеградации полимеров был проведен среди грибов из родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Parengyodontium*, известных как бидеграданты полимеров. Штаммы были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина (ВКМ) и кафедры Биологии почв МГУ.

Биодеградацию образцов PCL изучали в модифицированной среде Чапека-Докса, а образцов PLA, DL-PLA - в трех средах. Эксперименты проводили в течение 30 сут при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$; биодеградацию пленок PP1, PP2 и PCL4 проводили на поверхности агаризованных сред при $26 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев. Биодеградацию полимеров оценивали по уменьшению веса образцов полимеров после инкубации с грибами, а также с помощью масс-спектрометрии образцов, оставшихся после разложения [4].

Отбор наиболее активного бидеграданта поликапролактона проводили среди 7 штаммов грибов с использованием образца PCL2 (M_w 25900 г/моль). Обнаружено, что все изученные штаммы были способны деградировать полимер, но скорость биодеградации была различна и определялась физиолого-биохимическими особенностями штаммов. Наибольшую скорость деградации полимера показал *F. solani* ВКМ F-4202 (0.026 мг/мг·сут, за 30 сут деградация 90%). Грибы *F. verticillioides* ВКМ F-1980, *P. chrysogenum* ВКМ F-227 и *F. solani* ВКМ F-2316 за это время смогли деградировать 40, 34 и 24% полимера, соответственно. Деградация полимера другими штаммами была ниже (около 10%).

При биодеградации полимеров PCL1, PCL2, PCL3, грибом *F. solani* ВКМ F-4202 обнаружено, что за 30 сут степень разложения PCL1, PCL2, PCL3 составила 66, 90 и 18%, соответственно. Наибольшая скорость биодеградации наблюдалась для полимера PCL2, имеющего меньшую молекулярную массу и полидисперсность.

Была изучена биодеградация пленки PCL4 грибом *A. calidoustus* ВКМ F-2909. Через полтора месяца инкубации наблюдали образование желтоватого налета, потерю эластичности и деформацию края пленки. При микроскопии обнаружено развитие темноокрашенного мицелия в толще материала. Спустя 6 месяцев пленка полностью разложилась.

Известно, что на биодеградацию полилактидов существенное влияние оказывает состав питательной среды культивирования. Было обнаружено, что биоразложение полимера штаммами происходило только в среде 5/5. Наибольшую скорость деградации образца PLA1 имели штаммы *Parengyodontium album* ВКМ F-3028 и *A. calidoustus* ВКМ F-2909 (за 30 сут деградировано около 30% полимера, удельная скорость биодеградации составила 0.015 и 0.017 мг/мг·сут, соответственно).

При биодеградации полилактидов PLA1-3, DL-PLA грибом *Parengyodontium album* ВКМ F-3028 установлено, что наиболее биодеградебельным является образец DL-PLA

(удельная скорость биodeградации в 1.4-9 раз выше по сравнению с другими образцами), что объясняется аморфной структурой. Образцы PLA1, PLA2 и PLA3 имели различные молекулярные массы, полидисперсность и кристалличность. Образцы PLA1 и PLA2 подвержены биоразложению примерно одинаково, а PLA3 – менее биodeградебельный образец, что, по-видимому, связано с его высокой кристалличностью.

Была проведена оценка биodeградации грибом *Parengyodontium album* двух пленок полипропилена, содержащих около 5 мас.% DL-полилактида (PP1, PP2). Через 1 месяц культивирования наблюдали процесс колонизации пленок грибом: помутнение пленок и тонкий ветвящийся мицелий на их поверхности. В течение полугода наблюдения существенных изменений в массе и структуре пленок не отмечены.

Таким образом, в процессе скрининга были отобраны мезофильные штаммы грибов, которые способны биоразлагать PCL и PLA - *F. solani* ВКМ F-4202 и *Parengyodontium album* ВКМ F-3028, соответственно. Обнаружена зависимость биodeградации PCL и PLA от молекулярной массы, полидисперсности, кристалличности полимеров. Наиболее деградебельными оказались образцы PCL-2 (низкая молекулярная масса) и DL-PLA (низкая кристалличность). Масс-спектральный анализ остатков полимеров после биоразложения показал, что биodeградация полилактидов прошла хуже, чем поликапролактонов. Наблюдалась колонизация пленок PP1 и PP2 *Parengyodontium album*.

Литература

1. Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu ChU, Aiba S (2009) Biodegradability of plastics. *Int J Mol Sci* 10:3722–3742
2. Zaitsev KV, Piscun YA, Oprunenko YF, Karlov SS, Zaitseva GS, Vasilenko IV, Churakov AV, Kostjuk SV (2014). *J Polym Sci A* 52:1237–1250
3. Nedorezova P.M., Aladyshev A.M., Savinov D.V., Veksler E.N., Tsvetkova V.I., Lemenovskii D.A (2003) *Kinet. Catal.* 44:311-318.
4. Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Zaitsev K.V., Nedorezova P.M., Aladyshev A.M., Klyamkina A.N., Kostyuk S.V., Anastasiya A. Danilogorskaya A.A., Kozlovsky A.G. (2018) *J. Polym. Environm.* <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1307-3>

Новые психрофильные бактерии и определение их способности к трансформации стерина и холевых кислот

Замалутдинова С.В.¹, Трубицын В.Э.², Децереvская Н.О.², Донова М.В.², Щербакова В.А.²

¹Биотехнологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Микроорганизмы вечной мерзлоты являются продуцентами психроактивных ферментов и проводниками процессов в холодных условиях [1, 2, 3]. Низкотемпературная трансформация и деградация таких широко распространенных в природе соединений, как стерина (холестерин, ситостерин) и холаты важна для эkoбиотехнологии, однако, практически не изучена.

Целью работы была идентификация микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых отложений о. Западный Шпицберген, и изучение их способности к конверсии стерина и холевых кислот.

Объектами исследования являлись штаммы, выделенные из образцов мерзлых отложений в районе п. Баренцбург с глубин от 0,5 до 3,7 м. Для выделения и поддержания культур штаммов были использованы среды (г/л): ½TSA – триптон-соевый агар

(гидролизат казеина – 15, папаиновый перевар соевой муки – 5, NaCl – 5, агар – 15) и МПА – мясо-пептонный агар (дрожжевой экстракт – 10, соевый экстракт – 10, гидролизат казеина – 5, аминокислота – 5, агар – 20). Выделение и очистку хромосомной ДНК проводили по модифицированному методу Мармура. При проведении ПЦР использовали универсальные праймеры к гену 16S рНК 27f и 1492r. Филогенетический анализ проводили с использованием пакета программ MEGA6с [4].

Трансформацию стероидных соединений (холевая, дезоксихолевая кислоты, ситостерин, холестерин) проводили при 20°C в течение не менее 120 часов, при концентрации субстрата 1 г/л в присутствии метилированного β циклодекстрина (1:1,5 мольн.) для стерина. Холевые кислоты вносили в 1 мл горячего метанола, во всех случаях использовали среду для трансформации на основе глицерина [5]. Стероиды экстрагировали этилацетатом (1:1 по объему) и разделяли с использованием пластин для тонкослойной хроматографии DC-Fertigfolien Alugram SilG/UV254 (Germany, Macherey-Nagel) в системе хлороформ/ацетон/уксусная кислота (1:1:0,01, объемн.) в случае конверсии холевых кислот, для разделения продуктов биотрансформации ситостерина и холестерина использовали систему бензол/ацетон (4:1 объемн.).

Всего в ходе исследований вечной мерзлоты было выделено 60 штаммов аэробных бактерий. Из них 24 штамма были идентифицированы до рода, у 16 штаммов секвенированы нуклеотидные последовательности гена 16S рНК. На основании полученных последовательностей (размером от 561 до 1403 п.о.) с применением нескольких алгоритмов построены топологически сходные филогенетические деревья. Филогенетический анализ показал, что половина культур принадлежала филуму *Actinobacteria* (родам *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Micrococcus* и *Fronidhabitans*), 5 штаммов относятся к филуму *Proteobacteria* (*Psychrobacter*, *Massilia*, *Pseudomonas*) и 3 штамма – к филуму *Firmicutes* (родов *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Sporosarcina*).

Способности к утилизации и трансформации ситостерина, холестерина, фитостерина, холевой и дезоксихолевой кислот были оценены у 13 холодоустойчивых культур. Опыт проводился при 20°C, поскольку повышение температуры культивирования до 30°C приводило к почти двукратному снижению их скорости роста. Штаммы *Psychrobacter* sp. ZMg10, *Cryobacterium* sp. CMb7, *Bacillus* sp. GPg2, *Arthrobacter* sp. EMg2 наиболее активно трансформировали холевую кислоту. Продуктами трансформации являлись в основном кетопроизводные холевых кислот, такие как 7-кетохолевая кислота, 3,7-дикетохолевая кислота, 3-кетодезоксихолевая кислота. Часть продуктов выделена, очищена и подлежит отдельной идентификации. Штамм *Arthrobacter* sp. EMg2 наиболее активно осуществлял деградацию дезоксихолевой кислоты: через 20-24 часа инкубации дезоксихолевая кислота обнаруживалась в следовых количествах. Однако повышение концентрации субстрата до 2 г/л приводило к снижению скорости деградации: через 24 часа в этом случае оставалось более 70% неконвертированного субстрата, что может быть связано с токсичностью высоких концентраций дезоксихолевой кислоты для актинобактерий. В отличие от холевых кислот, стерин слабо конвертировался исследованными штаммами даже в присутствии солибилизирующего агента – метилированного циклодекстрина.

Ранее о способности психрофильных актинобактерий и представителей рода *Psychrobacter* к росту или трансформации стероидных соединений не сообщалось. Представленные результаты расширяют представления о глобальном распространении и разнообразии стероидтрансформирующих бактерий.

Благодарности:

Исследование проводилось в рамках государственного задания ФАНО России (№ 0114-2018-303 0004).

Литература

1. Marx J.C., Collins T., D'Amico S., Feller G., Gerday C. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms // *Mar. Biotechnol.* (NY). – 2007. – V.9. – Iss.3. – p. 293-304.
2. Margesin R., Feller G. Biotechnological applications of psychrophiles // *Environ. Technol.* – 2010. – V.31. – Iss.8-9. – p. 835-844.
3. Yuan M.M., Jin Zhang J., Xue K., Wu L., Deng Y., Deng J. et al. Microbial functional diversity covaries with permafrost thaw-induced environmental heterogeneity in tundra soil // *Glob. Chang. Biol.* – 2018. – V.1. – p. 297-307.
4. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V.30 – Iss.12. – p. 2725-2729.
5. V.V. Kollerov, D. Monti, N.O. Deshcherevskaya, T.G. Lobastova, E.E. Ferrandi, A. Larovere b S.A. Gulevskaya, S. Riva and M.V. Donova. Hydroxylation of lithocholic acid by selected actinobacteria and filamentous fungi // *Steroids.* - 2013. – V.78. – p. 370-378.

Гетерологичная экспрессия генов анаэробной метакрилатной редокс системы *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Захарова М.В., Микулинская Г.В., Архипова О.В.

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, aroksan@gmail.com

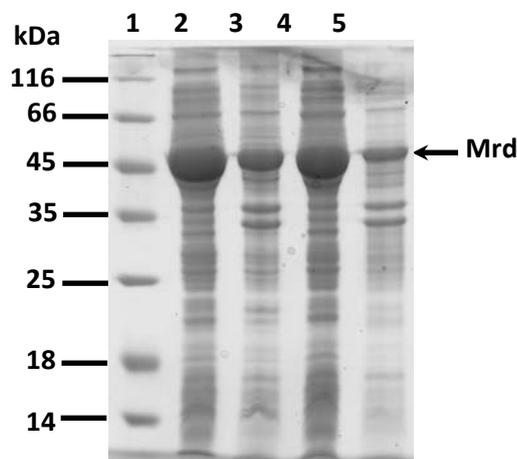
² ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова, г.Пущино, ¹вклад авторов одинаков

Необычная метакрилатная редокс система *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*) (Галушко и др., 1996; Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999) использует метакрилат в качестве терминального акцептора восстановительных эквивалентов, трансформируя его в изобутират в периплазме бактерии. Эта ферментная система двух-компонентна и включает в себя флавинодержащую метакрилатредуктазу Mrd (50 кДа) и её физиологический донор электронов – цитохром *c* Mcc (30 кДа). Оба хромопротеида были нами ранее получены в чистом виде, охарактеризованы, их гены секвенированы (Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999). Для дальнейшего исследования механизма катализа системой Mrd+Mcc, а также для возможного использования этих белков в целях биоремедиации отходов метакрилатных производств необходимо клонирование и экспрессия генов – либо гомологичная (в клетках типового штамма *G. sulfurreducens*), либо гетерологичная в клетках *E. coli*. Получить очищенные препараты рекомбинантных белков-компонентов метакрилатной редокс системы в случае успешного клонирования в клетки *E. coli* будет гораздо проще, чем из клеток *G. sulfurreducens* AM-1.

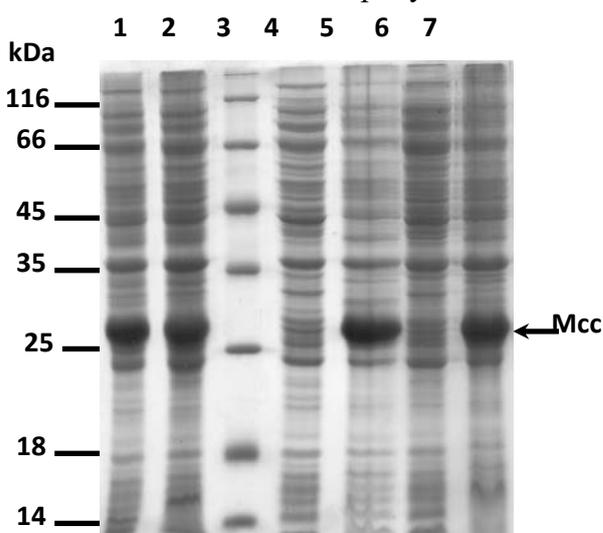
Целью нашей работы стало клонирование генов метакрилатредуктазы и цитохрома *c* бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 в клетки *E. coli* для получения штаммов-продуцентов компонентов этой метакрилатной редокс системы. Для успешной реализации поставленной цели необходимо было преодолеть ряд сложностей. Во-первых, оба компонента метакрилатной редокс системы имеют отщепляемые сигнальные пептиды разных типов (типа Tat у Mrd и типа Sec у Mcc), что свидетельствует о разных способах созревания белков. Во-вторых, успешное созревание цитохрома *c* подразумевает включение гемов, которое в природе происходит в периплазме в анаэробных условиях.

Клонирование гена метакрилатредуктазы с природной сигнальной последовательностью типа Tat и его дальнейшая экспрессия не привели к периплазматической локализации, целевой белок полностью оказался в телах включения. Следующим шагом явилось клонирование кодирующей последовательности зрелой части белка в модифицированный плазмидный вектор pQE30, лишенный His-taq. Экспрессия гена в штамме *E. coli* M15, содержащем плазмиду pREP4, индуцированная ИПТГ, привела к получению целевого продукта, частично растворимого, а частично локализованного в цитоплазме в виде тел включения. Проблему растворимости удалось решить с помощью низкотемпературной экспрессии: понижение температуры после индукции уже до 23°C привело к получению почти полностью растворимой цитоплазматической метакрилатредуктазы (рис. 1).

Рис. 1. Электрофореграмма белков клеточных фракций штамма *E. coli* M15(pREP4) – продуцента метакрилатредуктазы: 1- маркеры молекулярной массы, 2- клон 5, 20мкМ ИПТГ, супернатант, 3 - клон 5, 20мкМ ИПТГ, осадок, 4 - клон 6, 200 мкМ ИПТГ супернатант, 5 - клон 6, 200 мкМ ИПТГ, осадок.



Клонирование гена цитохрома *c* с природной сигнальной последовательностью типа Sec также не привело к успеху: продукт был гетерогенен по молекулярной массе, не имел периплазматической локализации и впридачу находился в цитоплазме в телах включения. Следующим шагом стало клонирование гена цитохрома *c* с отщепляемой сигнальной последовательностью *relB* в плазмиду pET22. Аэробная экспрессия в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3) привела к получению продукта, молекулярная масса которого (25 кДа) свидетельствовала об отсутствии гемов. Поэтому мы экспрессировали целевой ген при пониженной до 25°C температуре в штамме, содержащем вспомогательную плазмиду pEC86 (Arslan et al., 1998), несущую кластер генов *E. coli cstABCDEFGHIH*, ответственных за созревание цитохромов *c* и в геноме экспрессирующихся в анаэробных условиях. Результатом явилась успешная продукция полноразмерного белка в аэробных условиях (рис. 2). Пока нерешенной проблемой остается локализация продукта в мембраносвязанной фракции. В дальнейшем мы



планируем либо модифицировать условия выделения белка (значительно увеличить концентрацию соли в буфере разрушения), либо удлинить линкер между сигнальной последовательностью и зрелым белком.

Рис. 2. Электрофореграмма белков клеточных фракций штамма *E. coli* BL21(pEC86) – продуцента цитохрома *c*: 1- клон 2, 200 мкМ ИПТГ, 2- клон 7, 20мкМ ИПТГ, 3- маркеры молекулярной массы, 4- клон 2, супернатант, 5 - клон 2, осадок, 6 - клон 7, супернатант, 7 - клон 7, осадок.

Таким образом, мы осуществили успешную гетерологичную экспрессию обоих компонентов уникальной метакрилатной редокс-системы анаэробной бактерии в аэробных условиях. В дальнейшем компоненты необычной ферментной системы,

трансформирующей токсичное синтетическое органическое соединение метакрилат, содержащееся в отходах производств, будут получены в гомогенном виде и охарактеризованы, что позволит вовлечь их в очистку окружающей среды от токсических соединений и охрану здоровья человека.

Литература

1. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
2. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
3. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.
4. Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Künzler P, Thöny-Meyer L. Biochem Biophys Res Commun. 1998. V. 251. № 3. P. 744-747.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01068-а «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

***Trichococcus psychrophilus* sp. nov. – новая факультативно анаэробная бактерия, выделенная из железовосстанавливающего микробного сообщества холодного минерального источника**

Захарюк А.Г., Щербакова В.А.

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

В настоящее время в мире наблюдается растущий интерес к использованию холодоустойчивых микроорганизмов в биотехнологии (Muñoz et al., 2017). Показано, что психрофильные и психротолерантные бактерии представляют интерес с точки зрения защиты растений (Subramanian et al., 2011), биоремедиации в условиях низких температур, а также, поиска ферментов, активных при низких температурах (Kuddus & Ramteke, 2012; Lee et al., 2018). Несмотря, на холодные и олиготрофные условия в экосистемах, с постоянной низкой положительной температурой, активно функционируют разнообразные микробные сообщества (Ting et al., 2010).

Целью нашего исследования было выделение и описание психрофильных анаэробных микроорганизмов, осуществляющих деструкцию органического вещества в донных осадках холодного минерального источника Буксыхен (Северное Прибайкалье, Россия).

Объектами исследования служили образцы донных осадков минерального источника Буксыхен, расположенного в Северном Прибайкалье (Россия). Вода в источнике гидрокарбонатно-кальциевая ультрапресная, с минерализацией 90 мг/л и рН 7.4 – 8.6. Температура воды независимо от сезона составляет от 3.5 до 7.5°C.

Из накопительной культуры психрофильных железовосстанавливающих бактерий, полученной в результате длительной инкубации при 7°C с цитратом Fe(III) в качестве акцептора электронов и формиата, в качестве донора электронов, методом селективного посева с антибиотиками, нами выделен бактериальный спутник – штамм SKBG. Выделенный организм в течение продолжительного времени пересевался и активно рос в смешанной культуре железоредукторов. Клетки штамма SKBG представляли собой грамположительные кокки, часто соединенные в длинные цепочки. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показал, что изолят относится к

семейству *Carnobacteriaceae*. Ближайшими родственниками оказались виды рода *Trichococcus* (99% сходства). Все известные и охарактеризованные на сегодняшний день виды этого рода имеют высокий уровень сходства (99.9 – 100%) нуклеотидных последовательностей по гену 16S рРНК. Между тем, для всех изученных видов рода *Trichococcus* показаны существенные физиологические отличия.

Штамм SKBG был факультативным анаэробом и рос как в аэробных, так и в анаэробных условиях. На 5-7 сутки культивирования при 7°C в аэробных условиях на агаризованной среде штамм образовывал светло-оранжевые колонии округлой формы с ровными краями диаметром от 0.5 до 3.0 мм. Оптимальный рост наблюдался при pH 7.6, диапазон pH 7.0 – 9.5. Новый изолят – облигатно психрофильный микроорганизм с оптимумом роста при 10°C и диапазоном развития при температуре 0 – 35°C. Роста выше 38°C не наблюдали.

Штамм, долгое время пересевавшийся в смешанной культуре на среде с цитратом Fe(III) и формиатом, использовал цитрат, лактозу и целлобиозу в качестве единственных источников углерода и энергии, и не рос на формиате, лактате, фруктозе, сахарозе, пептоне, казаминовых кислотах и дрожжевом экстракте. В отличие от всех известных видов рода *Trichococcus*, изолят не сбразивал глюкозу.

Проведенные нами исследования выявили значительные фенотипические отличия выделенного штамма и представителей известных видов рода *Trichococcus* (табл.1). Все валидно описанные на настоящий момент виды рода *Trichococcus* относятся к психротолерантным мезофилам и способны расти при низких температурах. Однако оптимум температуры для роста у них наблюдали в пределах 25 – 30°C. Нами впервые выделен и охарактеризован первый облигатно психрофильный представитель рода *Trichococcus*, который мы предлагаем отнести к новому виду данного рода с предложенным названием *Trichococcus psychrophilys* sp. nov. и типовым штаммом SKBG^T (= VKM B-3241^T). Последовательность гена 16S рРНК была помещена в GenBank под номером MH569475.

Табл. 1. Дифференцирующие характеристики штамма SKBG^T и известных видов рода *Trichococcus*
Штаммы: 1, штамм SKBG^T VKM B-3241^T; 2, *T. flocculiformis* DSM 2094^T; 3, *T. palustris* DSM 9172^T; 4, *T. collinsii* DSM 14526^T; 5, *T. pasteurii* DSM 2381^T; 6, *T. patagoniensis* DSM 18806^T; 7, *T. ilyis* DSM 22150^T; 8, *T. paludicola* DSM 104691^T; 9, *T. alkaliphilus* DSM 104692^T

н.д. – нет данных

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Форма клеток	Длинные цепочки кокков	Длинные цепочки кокков	Кокки	Палочки	Короткие цепочки кокков	Кокки	Кокки	Кокки	Кокки
Температура, °C	0-35	4-39	0-33	-5-36	0-42	-5-35	4-40		4-37
Оптимум	10	25-30		23-30	25-30	28-30	30		25
Диапазон pH	7.0-9.5	5.8-9.0	6.2-8.4	6.0-9.0	5.5-9.0	6.0-10.0	6.0-9.6		7.0-10.5
Оптимум	7.6	8.0	7.5	7.5	н.д.	8.5	7.8		9.0
Субстраты:									
Формиат	-	н.д.	н.д.	н.д.	-	-	-	-	-
Лактат	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Цитрат	+	+	н.д.	+	+	+	+	+	+
D-Глюкоза	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Фруктоза	-	+	н.д.	н.д.	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Целлобиоза	+	+	+	+	+	н.д.	+	+	+
Сахароза	-	+	н.д.	н.д.	+	+	+	+	+
Источник выделения	Холодный источник, Россия	Осадки очистных сооружений, Германия	Болота Россия	Место разложения углеводов, США	Септическая яма, Германия	Гуано пингвина, Южная Америка	Психрофильный биореактор, Нидерланды		Болотные угодья, Китай

Литература

1. Muñoz P. A., Márquez S. L., González-Nilo F. D., Márquez-Miranda V. , Blamey J. M. Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria // *Microb Cell Fact.* 2017. V. 16. P. 138-151.
2. Subramanian P., Joe M., Yim Woo-Jong, Hong Bo-Hui, Tipayno S., Saravanan, V. S., Yoo Jae-Hong, Chung Jong-Bae, Sultana T., Sa Tong-Min. Psychrotolerance Mechanisms in Cold-Adapted Bacteria and their Perspectives as Plant Growth-Promoting Bacteria in Temperate Agriculture // *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer.* 2011. V. 44. P. 625-636.
3. Kuddus M., Ramteke P.W. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases // *Crit Rev Microbiol.* 2012. V. 38. P. 330-338.
4. Lee G. Li Yin, Ahmad S., Yasid N. A., Zulkharnain A., Convey P., Johari W. L. W., Alias S. A., Gonzalez-Rocha G., Shukor M. Yu. Biodegradation of phenol by cold-adapted bacteria from Antarctic soils // *Polar Biology.* 2018. V. 41. P. 553-562.
5. Ting L., Williams T. J., Cowley M. J., Lauro F. M., Guilhaus M., Raftery M. J. and Cavicchioli R. Cold adaptation in the marine bacterium, *Sphingopyxis alaskensis*, assessed using quantitative proteomics // *Environm. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 2658–2676.

Оригинальный методический подход для получения чистых фракций вещества каналов – уникальных структур клеточной стенки дрожжей при росте на углеводородах

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
г. Пущино, dmitriev@ibpm.pushchino.ru

Целью данной работы была разработка метода отделения и фракционирования экзоцеллюлярных компонентов уникальных структур клеточной стенки дрожжей – каналов при росте на углеводородах [1,2,3]. Без решения этой задачи весьма затруднительно выявить специфические белки и углеводные компоненты, входящие в состав каналов и экзоцеллюлярных структур, а также оценить возможность присутствия в составе каналов других соединений, в частности неорганических полифосфатов и липидов. Это, в свою очередь, тормозит генетические исследования, в частности, - получение нокаут-мутантов по выявленным белкам, предположительно входящим в состав каналов клеточной стенки *Candida maltosa*, и установлению изменений в физиологии таких мутантов при культивировании на углеводородах.

Предпосылкой для проведения этих экспериментов послужили наши данные об исчезновении каналов в клеточной стенке при переносе клеток, утилизирующих углеводороды в культуральную среду с глюкозой. При этом новые клетки (почки) образовывались уже без каналов (рис.1А).

Дрожжевые клетки с каналами, выращенные на углеводородах, переносили в среду, состоящую из 1% глюкозы на 0,05 М фосфатном буфере, рН 6,8. В этих условиях дрожжевые клетки не размножались из-за отсутствия в среде необходимых ростовых факторов. Электронно-микроскопическая цитохимическая реакция с диаминобензидином на окислительные ферменты [1] была использована в качестве маркера вещества каналов (Рис 1Б).

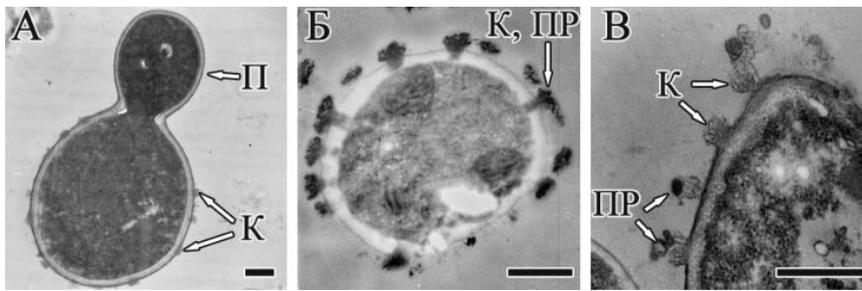


Рис 1. Ультратонкие срезы *Candida maltosa*. А – клетки с каналами после переноса в ростовую среду с глюкозой образуют новые клетки (почки) без каналов. Б – цитохимическая реакция с диаминобензидином на окислительные ферменты. В – редукция клеточной стенки при переносе в неростовую среду с глюкозой путём выброса вещества каналов в окружающую среду. Условные обозначения: К-канал, ПР – продукт реакции на окислительные ферменты. Метка – 0,5 μm

Электронно-микроскопический анализ этих клеток показал, что после 3-х часовой инкубации в буфере с глюкозой наблюдалось резкое сокращение числа "каналов", а на многих клетках - почти полное исчезновение, сопровождающееся выбросом их содержимого (Рис 1В). У контрольных клеток наблюдалась типичная картина связывания вещества каналов 3,3-диаминобензидином. (Рис 2Б). На поверхности опытных клеток и в среде культивирования отмечалось появление значительного количества везикулярных образований, дающих реакцию с диаминобензидином (Рис 2В).

На срезах можно проследить динамику образования везикул (рис. 2).

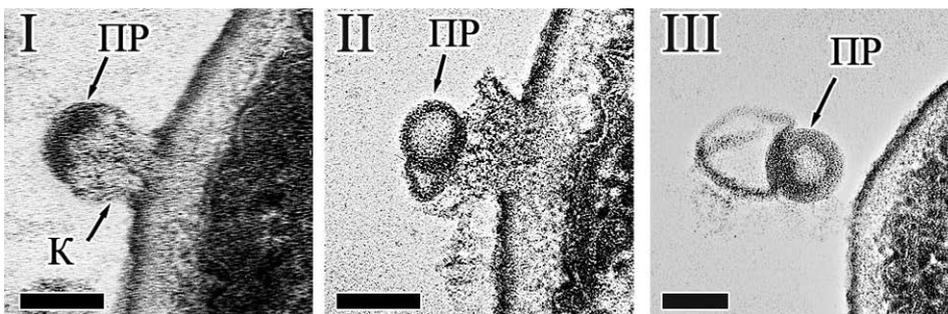


Рис 2. Различные стадии выброса вещества каналов в окружающую среду. I – концентрация белков, дающих реакцию на окислительные ферменты, на наружных фибриллярных компонентах канала. II – формирование белковой везикулы. III – отделение белковой везикулы от клетки. Редукция клеточной стенки. Условные обозначения: К-канал, ПР - продукт реакции на окислительные ферменты. Метка – 0,1 μm

Сопоставление различных стадий формирования везикул на ультратонких срезах показывает, что везикулы образуются из фибриллярного вещества каналов. Наглядное представление об этом процессе дает схема, представленная на Рис 3.

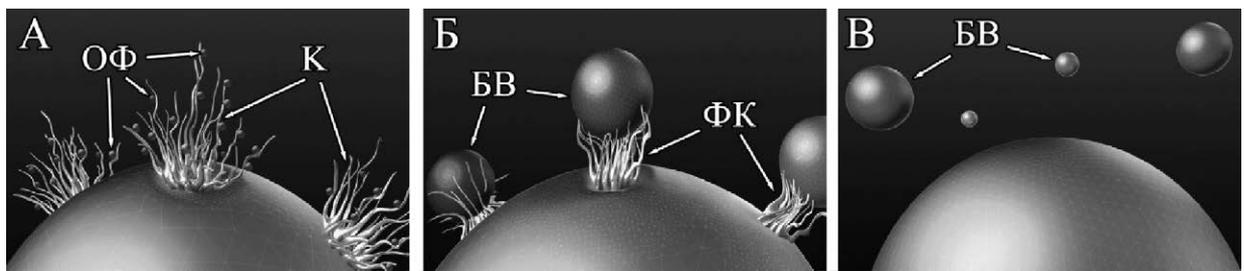
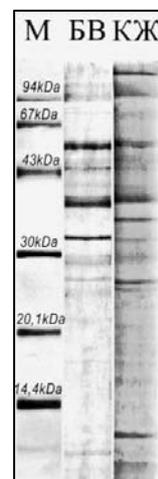


Рис 3. Компьютерная реконструкция выброса вещества каналов. А – канал в клеточной стенке *C. maltosa*. Б – формирование белковой везикулы. В – редукция клеточной стенки. Условные обозначения: К – канал, ОФ – окислительные ферменты, БВ – белковая везикула, ФК – фибриллярные компоненты.

Предварительный сравнительный электрофорез в ПААГ экспортируемых в среду везикул показал, что их белковый профиль существенно отличается от белкового профиля культуральной жидкости без редукции клеточной стенки (Рис 4: М – метчики, БВ – белковые везикулы, КЖ - культуральная жидкость).

Таким образом, результатом данной работы является методический подход, позволяющий получить фракцию вещества модифицированных зон клеточной стенки - каналов для дальнейшей расшифровки функции этих уникальных структур.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00396А «Структурно-функциональные перестройки клеточной оболочки дрожжей при адаптации к потреблению углеводов и голоданию.»



Литература

1. Dmitriev V. V. et al. Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media //FEMS microbiology letters. – 2011. – Т. 315. – №. 2. – С. 134-140.
2. Dmitriev V. V. et al. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions //Yeast. – 2016. – Т. 33. – №. 2. – С. 55-62.
3. Zvonarev A.N. et al. Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates// FEMS yeast research. – 2017. – 17(3).

Обнаружение I-форм Pf-подобных бактериофагов в лизатах *P. aeruginosa* РАОІ экстрактами фекалий зубров

Зимин А. А.^{1,2}, Никулин Н.А.^{1,3}, Скобликов Н.Э.⁴, Сузина Н.Е.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино boich@ibpm.pushchino.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования,
Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования,
Вятский государственный университет, г. Киров

⁴ ФГБНУ Краснодарский научный центр по ветеринарии и животноводству, г. Краснодар

Pseudomonas aeruginosa - это оппортунистический патоген. Он вызывает ряд хронических инфекции. На слизистой при такой хронической инфекции могут возникать бактериальные биопленки. Например, подобная ситуация развивается при псевдомонадном кистозном фиброзе в дыхательных путях у человека. *P. aeruginosa* образует биопленки за счет образования агрегатов бактериальных клеток. Структурно - эти агрегаты представляют собой кластеры бактериальных клеток, заключенных в полимерную матрицу, которая защищает бактерии от воздействия окружающей среды и лечения антибиотиками. Бактериофаги различным образом участвуют в развитии инфекции и образовании биопленок. Это, например, участие фагов в образовании бактериальных биопленок (1,2). При этом данный нитевидный фаг Pf накапливается в матрице биопленки и его накопление приводит к структурной трансформации биопленки в высокоупорядоченный жидкий кристалл. Эта структурная конфигурация способствует бактериальной адгезии, преодолению высушивания и устойчивости к антибиотикам. Нитчатые фаги псевдомонад достаточно хорошо изучены, но для этой группы бактериофагов пока не обнаружены дефектные формы и другие абберации. Например, для нитчатого колифага м13 давно обнаружены так называемые I-формы (интермедиаты) или укороченные фаговые частицы (3), они обнаружены как у фагов дикого

типа, так и искусственных генно-инженерных конструкций на основе фага м13. В задачи этой работы входило обнаружение таких интермедиатов полных частиц псевдомонадных нитчатых бактериофагов в условиях приближенных к природным. Наличие в фекалиях зубров бактериофагов данного типа и их I-форм весьма актуально в связи с планами создания большого (до 1000 особей) стада свободноживущих зубров, мигрирующих на территории густонаселенных Калужской и Орловской областей.

Методика. Материалом для исследования послужили пробы фекалий зубров (*Bison bonasus L.*). Отбор проб проводили из различных мест обитания, включая загон для ослабленного молодняка. Для получения фаговых экстрактов 2 г фекалий суспендировали в 8 мл фагового буфера. Далее перемешивали в орбитальном шейкере в течение 20 минут при 100 об/мин 22°C и разливали по 5 мл. Центрифугировали и супернатант хранили в буфере с 50% глицерина. Высев на газон штамма *Pseudomonas aeruginosa PAO1* на среде LB проводили после 3 месяцев хранения при -70°C. Для хранения добавляли глицерин до 50% (об/об) и хранили при -20°C. Очистку фаголизатов от бактерий проводили путем фильтрации через фильтры фирмы Millipore с отверстиями 0.22 мкм. Концентрирование фаговых лизатов проводили в микроцентрифуге с использованием центрифужных насадок Vivaspin 500 (VS0151) с мембранами 300.000 MWCO PES. Препараты фагов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) контрастировали 1% водным раствором уранилацетата. Определение размеров частиц нитчатых бактериофагов проводили с помощью программы ImageJ (imagej.nih.gov).

Результаты исследований. На ТЭМ снимках были обнаружены вирусоподобные частицы по морфологии сходные с бактериофагами семейства *Inoviridae* морфотипа F1. Длина частиц составляла около 1000 нм и толщина около 17 нм. Было видно различное устройство концов частиц. У нитчатого бактериофага Pf *P. aeruginosa* морфотипа F1 концы частиц также различаются по строению. У обнаруженных нами частиц один конец представляет собой заостренную головку, а другой немного расширен и имеет диаметр 20 – 23 нм. Бактериофаг Pf играет существенную роль в патогенезе синегнойной палочки. Для образования структурированных биопленок этого патогена существенно и наличие в урожае фага укороченных частиц - I-форм. Большинство обнаруженных нами I-форм было длиной около 400 нм, то есть содержало примерно половину генома. Это явление может быть связано с наличием на геноме второй, дополнительной последовательности участка начала репликации. Наличие такой структуры может приводить к появлению укороченных геномов при разрешении (нарезании) длинных конкатемеров при созревании нитчатых бактериофагов. Обнаруженные в фекалиях зубров нитчатые фаги псевдомонад также могут быть спутниками патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

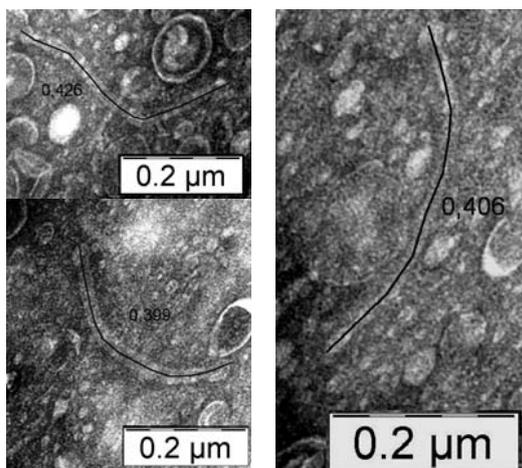


Рис. 1. Измерение размеров I - форм Pf-фагов образовавшихся при лизисе культуры *P. aeruginosa PAO1* экстрактами фекалий зубров (*Bison bonasus L.*). Измерение проведено с помощью программного средства ImageJ. Округлые фоновые частицы на сетке – везикулы, образующиеся при росте клеток штамма PAO1. На рисунке представлены вирусоподобные частицы наиболее часто встречающейся длины - около 400 нм.

Выводы

1. Нами были обнаружены Pf-подобные филаментные бактериофаги из фекалий зубров при выращивании на штамме *P. aeruginosa PAO1*.

- Показано с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, что точные размеры этих фагов группы F1 следующие: 981 нм – длина 17 нм – толщина вирусоподобных частиц.
- На ряде ТЭМ-снимков нами обнаружены I-формы бактериофагов этой группы.
- С помощью исследования ТЭМ снимков определены размеры укороченных частиц и их структура; 399, 406, 410, 418, 426, 601, 667, 803.

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

Литература

- Secor PR, Jennings LK, Michaels LA, Sweere JM, Singh PK, Parks WC, Bollyky PL. Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb Cell*. 2015 Dec 31;3(1):49-52.
- Mai-Prochnow A, Hui JG, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA. 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host'. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Jul;39(4):465-87.
- Manning M, Chrysogelos S, Griffith J. Mechanism of coliphage M13 contraction: intermediate structure is trapped at low temperatures. *J Virol*. 1981 Dec;40(3):912-9.

Влияние натуральных сорбентов и биопрепарата «Микробак» на скорость биоремедиации серой лесной почвы, загрязненной углеводородами нефти

Зиннатшина Л.В.¹, Ахметов Л.И.², Филонов А.Е.², Стрижакова Е.Р.¹, Васильева Г.К.¹

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН
г. Пущино

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, l.zinnatshina@mail.ru

Нефть и нефтепродукты являются приоритетными загрязнителями окружающей среды во многих развитых странах мира и особенно в РФ. Несмотря на высокую экономичность и экологичность метода биоремедиации, его применение на нефтезагрязненных почвах дает положительный результат лишь в 33% случаев (Alvarez, Walter, 2006). Ранее нами показано, что внесение активированного угля существенно ускоряет биоремедиацию почв, сильно загрязненных нефтью и другими загрязнителями. Основная цель данной работы заключалась в изучении влияния различных натуральных сорбентов на скорость биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

Исследования проводились в условиях двухлетнего микрополевого эксперимента на территории ИФХиБПП РАН. Серую лесную почву, отобранную с незагрязненного участка, помещали (по 10 кг) во врытые в землю пластиковые сосуды (площадь 0,1 м²), затем поверхностно загрязняли нефтью средней плотности в исходной концентрации 70 г/кг почвы. Обработку начинали через трое суток после выветривания легкой фракции при исходной концентрации углеводородов нефти (УВН) 49 г/кг почвы в её верхнем слое (10 см).

В основу эксперимента была положена методика биорекультивации *in situ* для поверхностно загрязненных почв, описанная в руководящем документе компании ПАО «Транснефть» [РД-13.020.40-КТН-208-14]. Для предотвращения избыточного подкисления во все почвы вносили доломитовую муку (3 г/сосуд), биопрепарат «Микробак», а также азофоску. Были заложены два контрольных варианта: с рекомендуемой (РД) и повышенной (РД+) дозой удобрений. Окончательное соотношение С:N:P:K в первом

случае достигало 1000:1:0,4:0,8, а во втором, как и во всех экспериментах с сорбентами, – 100:1:0,4:0,8. Сорбенты вносили в оптимальных дозах, установленных в предварительном лабораторном эксперименте: минеральные (цеолит, каолинит, вермикулит, диатомит) 0,2 и 0,5%, а углеродистые (гранулированный активированный уголь (ГАУ), биочар) и органические (торф) 0,5 и 2%. В начале второго сезона в почве определяли предельную влагоемкость (ППВ) и засевали сосуда клевером белым (*Trifolium repens*) для проведения доочистки методом фиторемедиации. Через два месяца измеряли размер листовой пластинки клевера, который использовали в качестве фитотеста. Почву периодически отбирали на анализ. Содержание УВН определяли методом ИК-спектрометрии (ПНД Ф16.1:2.2.22-98), а численность нефтедеструкторов (НД) – методом высева на агаризованную минимальную среду с парами дизельного топлива в качестве источника углерода и энергии.

Установлено, что в условиях средней полосы России для полной очистки почвы, загрязненной 5% выветренной нефти, требуется не менее двух лет. На рисунке 1 представлены результаты эксперимента к началу второго сезона. Показано, что важнейшим фактором, влияющим на скорость биоремедиации почвы (на фоне поддержания оптимальных условий аэрации и гидротермического режима), является оптимизация минерального питания. В варианте с повышенной дозой НРК (РД+) разложение УВН протекало значительно быстрее, чем при рекомендуемой в РД дозе. Дополнительным фактором, положительно влияющим на скорость биоремедиации, является внесение биопрепарата «Микробак» и, в особенности, натуральных сорбентов. К началу второго сезона концентрация УВН в почве в присутствии 0,5% минеральных и 2% углеродистых или органических сорбентов снизилась с 49 до 8-12 г/кг, тогда как в контрольном варианте РД+ с аналогичной дозой удобрений остаточная концентрация УВН была 13,6, а в РД – 19,5 г/кг.

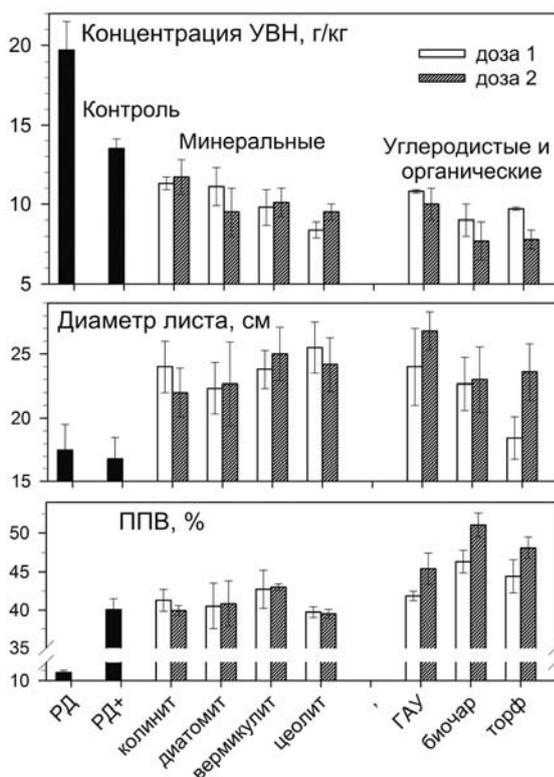


Рис. 1. Влияние двух доз сорбентов на остаточные концентрации УВН в нефтезагрязненной почве, средний диаметр листа клевера и ППВ почвы через 11 мес. очистки в сравнении с контролями РД и РД+

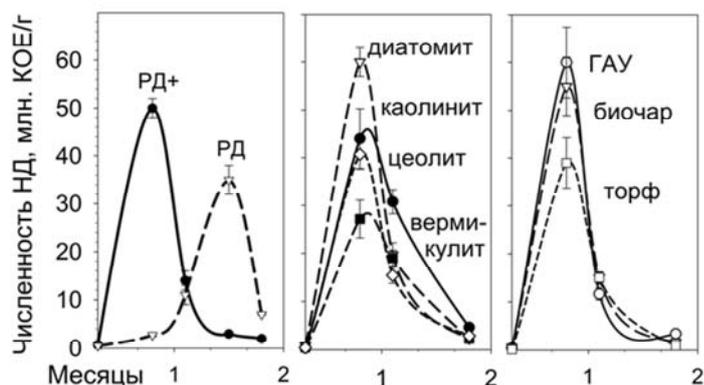


Рис. 2. Влияние максимальных доз натуральных сорбентов на динамику численности нефтедеструкторов в почве в ходе первых месяцев биоремедиации в сравнении с контролем РД и РД+.

Другим важнейшим механизмом положительного действия сорбентов, особенно углеродистых и органических, является повышение влагоемкости почвы. Сразу после загрязнения почвы нефтью ее влагоемкость резко снизилась с 39 до 8%. В контроле РД эта величина оставалась на низком уровне (11%) вплоть до начала следующего сезона, а в РД+ к этому времени ППВ повысилась до 40%. В вариантах с минеральными сорбентами ППВ загрязненных почв к этому времени мало отличалось от контроля РД+, тогда как с углеродистыми и органическими сорбентами эта величина повысилась до 43-52% в зависимости от сорбента и дозы.

Выводы о положительном действии большинства сорбентов на процесс биodeградации углеводородов подтверждаются результатами наблюдения за динамикой численности нефтедеструкторов. Уже через 10 сут. после начала обработки численность НД примерно на порядок превысила их численность в чистой почве (0,5 и 0,03 млн. КОЕ/г соответственно). Во всех почвах с повышенным уровнем НРК численность НД достигала максимума примерно через 1 месяц, а в варианте РД – позже – около 1,4 мес. при более низком максимум. В присутствии большинства сорбентов динамика изменения численности НД была сходной, а в вариантах с максимальной дозой диатомита, ГАУ и биочара она достоверно (на 10-20%) превышала контрольный уровень.

Таким образом, внесение оптимальных доз натуральных сорбентов на фоне оптимизации дозы минеральных удобрений существенно ускоряет процесс биоремедиации серой лесной почвы, загрязненной 5%(вес./вес.) выветренной нефти. Механизм их действия объясняется снижением токсичности, гидрофобности почв и улучшением водно-физических условий, что в конечном итоге обеспечивает условия для более эффективного микробного разложения углеводородов.

Благодарности.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-05-00617а

Анализ устойчивости к лекарственным препаратам штаммов, изолированных с детских площадок г. Пущино

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

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино tatiz@ibpm.pushchino.ru

²ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

Детерминанты устойчивости микроорганизмов к действию антибиотических веществ имеют весьма древнюю историю, однако только в последние годы проблема резистентности приобрела приоритетное значение, что связано с появлением нозокомиальных штаммов со множественной лекарственной устойчивостью. Известно, что неклиническим микроорганизмам принадлежит важная роль в поддержании и распространении генов антибиотикорезистентности в окружающей среде путём горизонтального переноса. Штаммы, устойчивые к антибиотикам, распространены практически повсеместно. С этой точки зрения общественные детские площадки могут представлять собой резервуар антибиотикорезистентных штаммов, которые могут попадать в организм ребёнка во время игры.

В данной работе были исследованы 8 детских площадок города Пушкино Московской области с различными типами покрытия: песок (площадка №1), грунт с песком (площадка №4), грунт (площадка №6), травяное покрытие (площадки № 2, 7 и 8) и современное покрытие для детских площадок с прессованной резиновой крошкой (площадки №3 и 5). Высевы производили на полноценную среду (LA), содержащую один из перечисленных антибиотиков в соответствующих концентрациях: цефтазидим (40 мг/мл), цефепим (40 мг/мл), меропенем (40 мг/мл), эритромицин (100 мг/мл), тетрациклин (30 мг/мл), канамицин (100 мг/мл), стрептомицин (100 мг/мл), хлорамфеникол (100 мг/мл), гентамицин (10 мг/мл), и линкомицин (100 мг/мл). Микроорганизмы резистентные ко всем использованным индивидуальным антибиотикам были обнаружены в пробах со всех детских площадок, за исключением площадки №1, где отсутствовали устойчивые к тетрациклину бактерии. Кроме того, мультирезистентные штаммы, устойчивые к трём и более антибиотикам были изолированы со всех площадок.

По результатам исследования самым чистым типом покрытия, как по общей численности культивируемых микроорганизмов (8×10^5 /г субстрата), так и по содержанию резистентных штаммов, оказался песок площадки №1. Наиболее загрязнёнными по общей численности культивируемых микроорганизмов ($1.2 - 1.9 \times 10^9$) и по содержанию резистентных к антибиотикам штаммов, оказались площадки № 3 и № 5, покрытые прессованной резиновой крошкой (Рис.1). Вероятно, пористое резиновое покрытие служит иммобилизирующим носителем для микроорганизмов и позволяет им формировать устойчивые к воздействию внешней среды биоплёнки. Дальнейшие исследования позволят выяснить какие именно детерминанты отвечают за распространение резистентности к антибиотикам в микробных сообществах детских площадок г. Пушкино.

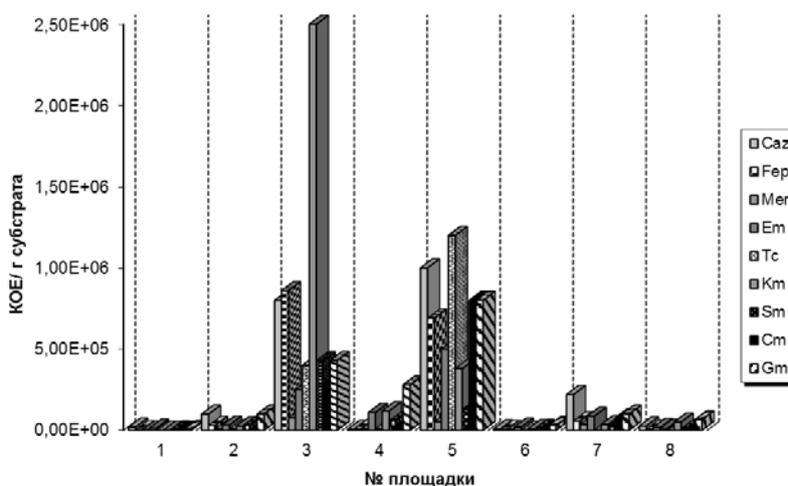


Рис. 1. Численность антибиотикорезистентных микроорганизмов, изолированных методом прямого высева из проб, отобранных с детских площадок г.Пушкино. Caz – цефтазидим, Fep – цефепим, Mer – меропенем, Em – эритромицин, Tc - тетрациклин, Km - канамицин, Sm - стрептомицин, Cm - хлорамфеникол, Gm – гентамицин

Влияние внутригенных антисмысловых промоторов на регуляцию экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции системы рестрикции-модификации II типа EcoRI

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Системы рестрикции-модификации (СРМ) широко распространены в царстве прокариот. Классические СРМ кодируют ферменты с двумя типами активности: ДНК-метилтрансферазы (М), способные метилировать определенные последовательности ДНК (сайты узнавания), и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), расщепляющие ДНК в соответствующих сайтах узнавания, если они не были прометилированы ранее. Основной функцией СРМ является защита бактериальной клетки от проникновения чужеродной ДНК (например, ДНК бактериофага) [5] и обеспечение, таким образом, стабильности генетического материала бактериального хозяина.

Для успешного установления СРМ в новой клетке бактериального хозяина необходимо чтобы экспрессия гена метилтрансферазы (*met*) происходила раньше, а ген эндонуклеазы рестрикции (*res*) экспрессировался с задержкой, позволяя ферменту М закончить модификацию ДНК хозяйской клетки. В противном случае клетка погибнет. Именно поэтому СРМ должны иметь очень тонкую и четкую регуляцию экспрессии генов.

СРМ имеют огромное разнообразие по структурно-генетическому устройству. Регуляция в них осуществляется также разными способами, в основном на уровне транскрипции. За последние три десятилетия были довольно детально описаны транскрипционные механизмы регуляции СРМ. Во многих СРМ роль регулятора несет на себе сама метилтрансфераза [2, 3, 4]. Иногда СРМ содержат дополнительные рамки считывания, кодирующие особый регуляторный белок [1]. Однако остается группа СРМ (например, EcoRI, Eco29kI), регуляция которых предположительно осуществляется на пост-транскрипционном уровне и остается до конца не изученной. По-видимому, основную роль в регуляции таких систем играют РНК молекулы, их стабильность и скорость деградации, а также эффективность инициации трансляции.

Данное исследование посвящено изучению механизмов регуляции экспрессии гена *res* СРМ EcoRI. СРМ EcoRI – это линейная СРМ II типа, которая состоит из 2-ух последовательно и однонаправлено расположенных генов: гена *res* и гена *met*. Ранее в СРМ EcoRI были обнаружены два перекрывающихся антисмысловых промотора (As1 и As2), расположенные внутри структурной части гена *res* и связанные с негативной регуляцией этого гена на уровне транскрипции по неустановленному механизму [6]. С помощью биоинформатического анализа с использованием приложения BPRM (Prediction of bacterial promoters) SoftBerry был детектирован дополнительный антисмысловый промотор (As3), располагающийся внутри гена *res* в 174 нуклеотидах от стартового кодона. Методом транскрипции *in vitro* было экспериментально показано наличие дополнительной +1 точки в антисмысловом направлении на расстоянии примерно 168 нуклеотидов от стартового кодона гена *res*, что подтверждает наличие биоинформатически предсказанного промотора, с которым могла связываться РНК-полимераза и осуществлять транскрипцию в условиях реакции *in vitro*. Дальнейшее клонирование антисенс-промоторного региона As3 в вектор, содержащий беспромоторный репортерный ген *galk* и выращивание штамма *E. coli* HB101, содержащего полученную конструкцию, на селективной среде МакКонки приводило к окрашиванию колоний, что указывает на эффективную транскрипцию с As3 промотора в условиях *in vivo*. Таким образом, с помощью экспериментальных методов *in vitro* и *in vivo* было подтверждено наличие As3, располагающегося внутри гена *res* на расстоянии около 175 н.п. от стартового кодона гена. Для сравнительного анализа промоторных областей

гена *res* СРМ *EcoRI* были проклонированы ДНК фрагменты, содержащие прямой (PR) и антисмысловые (As1, As2, As3) промоторы в вектор с репортерным геном *galK*. Клетки *E. coli* HB101, трансформированные плазмидой с репортерным геном *galK* под контролем As3 имели наиболее интенсивную окраску на индикаторной среде МакКонки. При сравнительном анализе силы PR и As1, As2, As3 *in vivo* с помощью метода RT-qPCR выявлено, что транскрипция с As3 происходит приблизительно в 5 раз эффективнее, чем с PR и в 10 раз, чем с As1 и As2. Для исследования влияния активности антисенс-промотора As3 на экспрессию гена *res* СРМ *EcoRI* были созданы плазмидные конструкции транскрипционно и трансляционно-слитые с репортерным геном *lacZ*, и которые содержали мутацию в -10 области антисмыслового промотора As3 (TTATACT->ACTGCAG). Изменения в активности β-галактозидазы в клетках, содержащих транскрипционные фьюжены с мутацией в As3 не было обнаружено, в то время как с помощью метода RT-qPCR было детектировано снижение относительного уровня транскриптов в 1,5 раза при наличии мутации в As3. Сравнительный анализ активности репортерного гена *lacZ* в клетках, содержащих трансляционные фьюжены с мутацией в As3, показал снижение экспрессии гена *res* приблизительно в 3 раза, при этом относительный уровень транскриптов также снижался примерно в 3 раза. Таким образом, экспериментально подтверждено участие антисмыслового промотора As3 в регуляции экспрессии гена *res* на уровне трансляции.

В результате исследования был экспериментально установлен антисмысловой промотор As3 (расположенный в структурной части гена *res* на расстоянии 175 н.п. от стартового кодона), с которого, синтезируется антисмысловая РНК, участвующая в положительной регуляции экспрессии гена *res* на уровне трансляции и предположительно влияющая на стабильность и скорость деградации мРНК, синтезируемой с рестриктазного промотора.

Литература

1. Semenova E., Minakhin L., Bogdanova E., Nagornykh M., Vasilov A., Heyduk T., Solonin A., Zakharova M., Severinov K. Transcription regulation of the EcoRV restriction-modification system // *Nucleic Acids Res.* — 2005 — V. 33. — P. 6942–6951.
2. Protsenko A, Zakharova M, Nagornykh M, Solonin A, Severinov K. Transcription regulation of restriction-modification system Ecl18kI // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — V. 37. — P. 5322–5330.
3. Som S., and Friedman S. Regulation of EcoRII methyltransferase: effect of mutations on gene expression and *in vitro* binding to the promoter region // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — V. — 22. — P.5347–5353.
4. Zakharova M., Minakhin L., Solonin A., and Severinov K. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 335. — P. 103–111.
5. Vasu K., Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense // *Microbiol Mol Biol Rev.* — 2013. — Vol. 77, № 1. — P. 53–72.
6. Liu Y., Kobayashi I. Negative regulation of the EcoRI restriction enzyme gene is associated with intragenic reverse promoters // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189, № 19. — P. 6928–6935.

Факультативный метилотроф *Ancylobacter* sp. Gurmol - холобионт моллюска *Donax trunculus* L.

Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г.Пущино,
lenokap80@gmail.com

Представители рода *Ancylobacter* - хемоорганотрофные бактерии, которые встречаются в различных экологических нишах (водная среда, донные отложения, растения) и играют важную роль в круговороте углерода. В настоящее время род представлен девятью валидно описанными видами бактерий: *A. aquaticus* (Raj, 1983), *A. rudongensis* (Xin *et al.*, 2004), *A. polymorphus* и *A. vacuolatus* (Xin *et al.*, 2006), *A. oerskovii* (Lang *et al.*, 2008), *A. dichloromethanicus* (Firsova *et al.*, 2010), *A. defluvii* (Poroshina *et al.*, 2014), *A. pratisalsi* (Suarez *et al.*, 2017), *A. sonchi* (Agafonova *et al.*, 2017), а также *A. abiegus* (Зайчикова с соавт., 2010), который пока не узаконен.

Анцилобактерии - аэробные, грамотрицательные палочковидные или бобовидные факультивно метилотрофные бактерии, способные хорошо расти как на C₁-соединениях (метаноле, метилированных аминах), так и на ряде полиуглеродных соединений (сахара, органические кислоты, аминокислоты, спирты). Несколько представителей этого рода выделены из растений и являются фитосимбионтами, поскольку синтезируют фитогормоны (ауксины и цитокинины), сидерофоры и солюбилизируют нерастворимый фосфор, переводя его в доступную для растений форму.

Из двухстворчатого моллюска донакса обрезанного (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758), выловленного в Черном море в районе г. Гурзуф (Крым) на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии нами выделен метилотрофный штамм Gurmol. *Donax trunculus* L. - вид двухстворчатых моллюсков из семейства донацид известен как «морская бабочка», которые повсеместно встречаются в Черном море, используются в пищу, высоко ценятся испанцами и итальянцами и являются объектом крупной профессиональной добычи.

Цель работы – характеристика нового метилотрофного изолята штамма Gurmol.

Новый изолят представлен грамотрицательными неспорообразующими бобовидными неподвижными клетками, которые размножаются бинарным делением (рис.1).

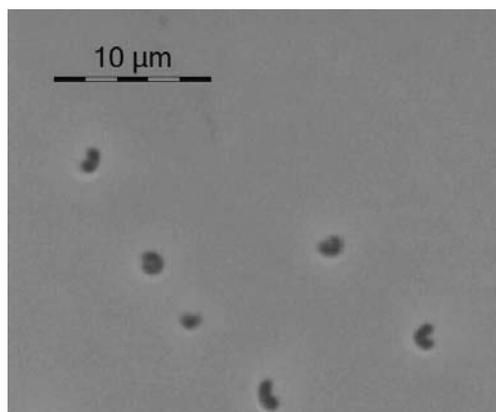


Рис. 1. Морфология клеток штамма *Gurmol*, выращенных на метаноле (фазовый контраст клеток, длина масштабной метки 10 мкм)

При культивировании штамм Gurmol на жидких средах с 0.5% метанола в качестве единственного источника углерода и энергии или с полиуглеродными субстратами при перемешивании на качалке 150 об/мин рост не обнаружен. Исследуемый штамм растет на

агаризованных и в стоячей культуре на жидких средах, при этом время удвоения составляет 2 суток. Не растет в строго анаэробных условиях. Штамм Gurmol растет в диапазоне температур 10-30 °С и pH 6.5-7.5, а также до 3% NaCl в среде. Изолят имеет высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с таковыми у представителей рода *Ancylobacter*: *A. dichloromethanicus* DM16^T ВКМ В-2484^T (99.7%) и *A. aquaticus* ATCC 25396^T (99.6%) (рис.2).

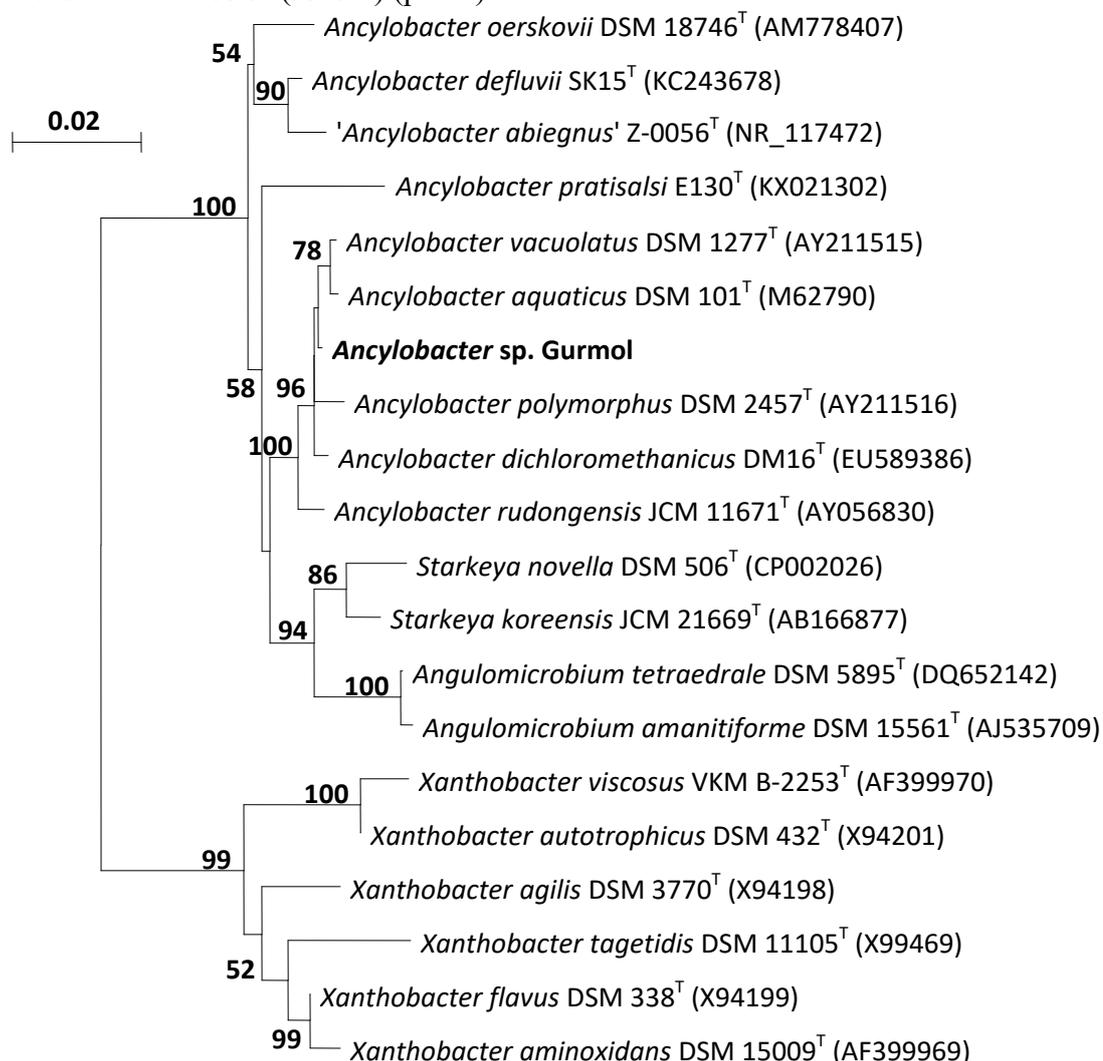


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма *Ancylobacter* sp. Gurmol, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 50%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Однако штамм *Ancylobacter* sp. Gurmol существенно отличается от ближайших представителей этого рода по фенотипическим характеристикам, является микроаэрофилом, галотолерантом, имеет низкую скорость роста как на С₁- так и на полиуглеродных субстратах и, очевидно, адаптирован к среде обитания, т.е является холобионтом (эндосимбионтом).

Распространение резистентных микроорганизмов и детерминант устойчивости к антибиотикам в очистных сооружениях г. Пущино

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

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

Возникновение патогенов с множественной лекарственной устойчивостью все чаще ставит под угрозу успешное лечение бактериальных инфекций и является глобальной проблемой в области здравоохранения, решение которой требует эффективных действий. Однако распространение резистентных патогенных микроорганизмов в клинике не может рассматриваться отдельно от процессов циркуляции детерминант устойчивости к антибиотикам в природных экосистемах. Загрязнение фармацевтическими отходами наземных и водных экосистем наблюдается повсеместно, причём порой концентрация антибиотиков в окружающей среде превышает их терапевтические уровни. Очистные сооружения, которые являются резервуарами устойчивых к антибиотикам бактерий, и, благодаря высокой плотности и разнообразию микробиоты активного ила служат «горячими точками» горизонтального переноса, рекомбинации и распространения генов антибиотикорезистентности и устойчивых к антибиотикам бактерий, которые затем могут попадать в окружающую среду, заслуживают особого внимания.

В данной работе охарактеризованы антибиотикорезистентные штаммы, изолированные методом прямого посева из пяти проб, отобранных из очистных сооружений г.Пущино в апреле 2015 г. на различных стадиях очистки. Проба № 1 отбиралась из песколовки и представляла собой мутную, сильно загрязненную жидкость. Проба № 2 отбиралась из канала, по которому очищаемые стоки попадают в первичные отстойники. Проба № 3 была взята из аэротенка, проба № 4 – из вторичных отстойников. Проба № 5 отобрана после последнего этапа очистки и представляла собой прозрачную жидкость. Проведён первичный анализ коллекции на устойчивость к антибиотикам: карбенициллину (66% микроорганизмов устойчивы), канамицину (45%), стрептомицину (48%), амикацину (41%), тобрамицину (29%), хлорамфениколу (35%), рифампицину (33%), гентамицину (38%), тетрациклину (20%), цефтазидиму (10%), цефепиму (8%) и меропенему (2%). Большинство исследованных штаммов оказались мультирезистентными и обладали устойчивостью к трем и более (до девяти) антибиотикам. Обнаружено, что если для одних антибиотикоустойчивых микроорганизмов обработка сточных вод приводила к значительному снижению численности, то для микроорганизмов, устойчивых к канамицину, стрептомицину, гентамицину и хлорамфениколу, общая численность была сходной во всех пяти пробах и составляла в среднем $10^3 - 10^4$ клеток/мл образца.

Мультирезистентные штаммы идентифицировали с использованием системы MALDI Biotyper. Наиболее часто встречающимися антибиотикоустойчивыми микроорганизмами в очистных сооружениях г. Пущино являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes*.

Поскольку в настоящее время тетрациклин является одним из наиболее широко применяемых антибиотиков в здравоохранении, сельском хозяйстве и животноводстве, а резистентные к тетрациклину бактерии распространены повсеместно, штаммы, изолированные из очистных сооружений г. Пущино тестировали на наличие *tet*-генов, отвечающих за различные механизмы резистентности. Показано, что наиболее распространенными среди исследованных штаммов, являются гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки, тогда как гены, обеспечивающие защиту рибосомы, встречаются значительно реже и составляют всего 8% от исследованных штаммов.

Гены антибиотикорезистентности обычно ассоциированы с мобильными генетическими элементами: плазмидами, транспозонами и интегронами. Коллекцию тестировали методом ПЦР в стандартных условиях на группы несовместимости и на присутствие генов, ассоциированных с интегронами I-го типа: гена интегразы, *intI1*, генов устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям, *qacE/qacΔE1*, и гена резистентности к сульфониламидам, *sul1*, который часто находится в 3'-консервативной области. Штаммы, содержащие гены *intI1*, *qacE/qacΔE1* и *sul1* составили четвертую часть от исследованных образцов. Двенадцать исследованных штаммов содержали кассеты генов резистентности к антибиотикам размером от 500 до 1500 т.п.н.

У четырех штаммов обнаружены IncN плазмиды, четыре штамма содержат плазмиды группы несовместимости P-9, три из которых являются конъюгативными и несут детерминанты устойчивости к тетрациклину, стрептомицину и гентамицину. Плазмиды биодеградации IncP-9 группы широко распространены среди почвенных псевдомонад, однако плазмид резистентности этой группы описано крайне мало. Несмотря на то, что плазмиды группы несовместимости P-1 считаются одним из основных носителей генов резистентности, в штаммах из очистных сооружений города Пущино плазмид данной группы обнаружено не было.

Анализ экспрессии гена *segB* в ходе инфекционного цикла фага T4

Кузницын Р.А., Григорьева Т.Ю., Макарова А.О., Майоров С.Г., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И. Э.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, rafailkuzn@gmail.com

Хоминг-эндонуклеазы – особый класс сайт-специфических нуклеаз, которые узнают протяженные вырожденные последовательности ДНК. Хоминг-эндонуклеаза инициирует перенос собственной ОРС и фланкирующих её областей в гомологичный локус ДНК родственных организмов, в котором соответствующая ОРС эндонуклеазы отсутствует. Данный тип генной конверсии был назван *хомингом*. Природные предпочтительные сайты хоминг-эндонуклеаз обнаруживаются в безнуклеазных аллелях родственных организмов. Как правило, инсерция гена хоминг-эндонуклеазы сопровождается нарушением предпочтительного сайта гидролиза, что защищает собственную геномную ДНК от потенциальных вредоносных разрывов.

Геном бактериофага T4 содержит 15 генов хоминг-эндонуклеаз, три из которых кодируются ОРС, имеющими интронную локализацию (I-TevI–III), а остальные двенадцать (MobA–E и SegA–G) – свободностоящими генами. Большинство хоминг-эндонуклеаз фага T4 охарактеризованы. В частности, их предпочтительные сайты локализованы в безнуклеазных аллелях T4-родственных бактериофагов, и показана способность инициировать хоминг собственных ОРС. Отличительной особенностью хоминг-эндонуклеаз фага T4 является их ослабленная субстратная специфичность. Как следствие, для ряда из них идентифицированы менее предпочтительные сайты узнавания в геноме T4, которые способны гидролизироваться при определенных условиях *in vitro*. В связи с этим, экспрессия генов хоминг-эндонуклеаз в ходе инфекционного цикла фага регулируется на уровне транскрипции, процессинга мРНК, а также трансляции.

Для эндонуклеазы SegB показано, что она обладает ярко выраженной ослабленной субстратной специфичностью. В экспериментах *in vitro* установлено, что помимо предпочтительного сайта ген тРНК^{Asn} фага T2L, она способна вносить разрывы практически во все гены тРНК фага T4. Избыток SegB в реакции приводит к появлению множества сайтов расщепления по всему геному T4. Это свидетельствует о том, что экспрессия *segB* должна находиться под строгим контролем. Ген *segB* расположен в

кластере генов тРНК. В ранних исследованиях в данной области были идентифицированы два промотора, P_{L2} и P_{M2}, которые могут контролировать экспрессию *segB* (Broida, Abelson, 1985). Несколько позже непосредственно перед иницирующим кодоном ОРС *segB* была обнаружена структура типа «стебель-петля», а также предсказан поздний промотор (P_{LS}), который расположен в данной структуре и, предположительно, контролирует экспрессию *segB* (Brok-Volchanskaya *et al.*, 2008; Edgell *et al.*, 2010). На основании анализа РНК бактериофага Т4 на микрочипах показано, что транскрипты, содержащие ОРС *segB*, преимущественно нарабатываются в среднее время инфекционного цикла (Luke *et al.*, 2002). Тем не менее, остается неясным, используются ли они в качестве матрицы для трансляции, или же мРНК *segB* синтезируется в минорных количествах в позднее время инфекции.

В данной работе был проведен поиск промотора, контролирующего экспрессию гена *segB*. Для этого нами разработана оригинальная экспериментальная модель, которая позволяет устанавливать время функциональной экспрессии эндонуклеазного гена. Предлагаемый подход основан на способности хоминг-эндонуклеазы вносить разрыв в установленный предпочтительный сайт *in vivo* и тем самым иницировать последующую репарацию поврежденной молекулы за счет гомологичной рекомбинации. С этой целью нами был сконструирован бактериофаг Т4*ets4*, который содержит делецию в гене *segB*, а также вставку *ets4* с фрагментом гена тРНК^{Asn} фага Т2L (сайт эндонуклеазы SegB) в гене *rIIB*. При скрещивании такого бактериофага с фагом Т4, кодирующим активную хоминг-эндонуклеазу SegB, будет происходить внесение разрыва в сайте *ets4*, последующая репарация поврежденной молекулы по интактному *rIIB*-аллелю фага Т4 дикого типа и, как следствие, исключение вставки *ets4* в потомстве. Для определения времени внесения разрыва проводили выделение фаговой ДНК на 9, 14, 20 и 26 минуте инфекционного цикла. Содержание маркера *ets4* оценивали методом «ПЦР в реальном времени» относительно стабильно наследуемого маркера *ivsX*. Поскольку на продолжительность инфекционного цикла фага могут оказывать влияние условия выращивания, анализ времени внесения SegB разрывов в фаговую ДНК проводили в сравнении с эндонуклеазой SegC, которая кодируется поздним геном. Для этого использовали ранее полученный фаг Т4*ets1*, который содержит делецию в гене *segC* и вставку *ets1c* сайтом эндонуклеазы SegC в том же положении гена *rIIB*. Было установлено, что содержание маркера *ets4* остается неизменным вплоть до 9 минуты инфекции. К 14 минуте относительное содержание *ets4* снижается в ~2,5 раза и продолжает незначительное снижение вплоть до 20 минуты, после чего выходит на плато. В тоже время относительное содержание маркера *ets1* остается практически неизменным вплоть до 15 минуты инфекции и снижается, как и *ets4*, в 2,5 раза только к 20 минуте.

Полученные нами результаты показывают, что функциональная экспрессия *segB* приходится на время активности «средних» промоторов, тогда как SegC-индуцируемые разрывы появляются позже, когда активны «поздние» промоторы. Тем не менее вопрос о влиянии обнаруженной структуры типа «стебель-петля» на регуляцию экспрессии *segB* остаётся открытым.

Взаимодействие целлобиозо дегидрогеназы гриба *Cerrena unicolor* с гуминовыми кислотами

Лисов А.В.^{1,2}, Белова О.В.¹, Лисова З.А.¹, Заварзина, А.Г.³, Леонтьевский А.А.^{1,2}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, пр-т ssl208@rambler.ru

²ФГБУО Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

³Московский государственный университет, Факультет почвоведения, Москва

Почва – сложная комбинированная структура, обладающая уникальным свойством – плодородием. Почвообразование является комплексным процессом, происходящим под воздействием биотических и абиотических процессов. Трансформация растительных остатков микроорганизмами является одним из главных механизмов, приводящим к образованию гуминовых соединений почвы. Грибы являются главнейшими микроорганизмами, перерабатывающими растительные остатки. Для разрушения растительных остатков грибы выделяют различные ферменты, как гидролазы, так и оксидоредуктазы. Одной из внеклеточных оксидоредуктаз, участвующих в разрушении клеточных стенок растений, является целлюбиозо дегидрогеназа (ЦДГ). Этот фермент катализирует окисление целлюбиозы до целлюбиона лактона окислителями, в первую очередь хинонами. Так же в качестве окислителя может выступать кислород, медленно восстанавливаемый ферментом в ходе реакции до перекиси водорода. Поэтому, в присутствии ионов Fe^{2+} и при образовании под воздействием ЦДГ перекиси водорода может происходить реакция Фентона с выделением свободных радикалов. Участие реакций с участием свободных радикалов в трансформации полисахаридов растений и лигнина, запускаемых ЦДГ, известно. ЦДГ активно продуцируется многими целлюлолитическими грибами. Однако роль этого фермента в трансформации гуминовых соединений неизвестна. Таким образом, целью данной работы было изучить трансформацию гуминовых соединений под воздействием ЦДГ.

Гриб *Serrena unicolor* является дереворазрушающим грибом и активно продуцирует различные ферменты в ходе роста на среде с микрокристаллической целлюлозой в качестве основного источника углерода. В том числе гриб активно продуцирует ЦДГ. Препарат ЦДГ был очищен из культуральной жидкости гриба до электрофоретически гомогенного состояния. Изучена реакция фермента с препаратом гуминовых кислот, выделенных из дерново-подзолистой почвы. Обнаружено, что в присутствии ЦДГ и целлюбиозы как донора электронов происходила эффективная деполимеризация гуминовых кислот. Без целлюбиозы деполимеризация не происходила, что указывает на окислительную природу наблюдаемой деполимеризации. Для подтверждения участия в реакции свободных радикалов было изучено влияние на деполимеризацию ингибитора реакций с участием радикалов, маннитола, и каталазы – фермента, катализирующего расщепление перекиси водорода. И маннитол, и каталаза ингибировали деполимеризацию гуминовых кислот, что подтверждает участие в реакции кислородных радикалов. Однако, для начала реакции Фентона необходимо наличие ионов Fe^{2+} , которые в реакционную смесь не добавляли. Однако в составе препарата гуминовых кислот присутствуют ионы железа. Поэтому, возможно, реакция Фентона поддерживается за счёт железа, присутствующего в препарате. Таким образом, нами впервые показано, что гуминовые кислоты трансформируются так же и ЦДГ грибов.

Трансформация С-19, С-21 стероидов и холевых кислот *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В.

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

Актинобактерии являются потенциальными биокатализаторами для модификации стероидов и получения новых соединений. Среди этой группы микроорганизмов представители *Mycobacterium* и *Nocardioides* являются эффективными продуцентами стероидных соединений (Донова, 2010; Donova and Egorova, 2012). Ранее было показано, что *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д, относящийся к подпорядку *Propionibacterineae*, способен проводить 1(2)-дегидрирование 3-кето-4-ен-стероидов андростанового и

пребывающего ряда с высокой селективностью (Fokina and Donova, 2003: Фокина с соавт., 2003, Sukhodolskaya et al., 2017).

В настоящей работе проведено изучение особенностей биоконверсии ряда С-19 стероидных соединений: дегидроэпиандростерона (ДГЭА), андрост-4-ен-3,17-диона (АД), андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) и тестостерона (Т); С-21 стероидов: прегненолона, прогестерона и 17-гидроксипрогестерона; желчных кислот: литохолевой, дезоксихолевой и холевого растущими клетками *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д.

Исследование конверсии ДГЭА, АД, АДД и Т *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д показало, что штамм активно трансформирует субстраты с последующей деструкцией образуемых продуктов (рис.1).

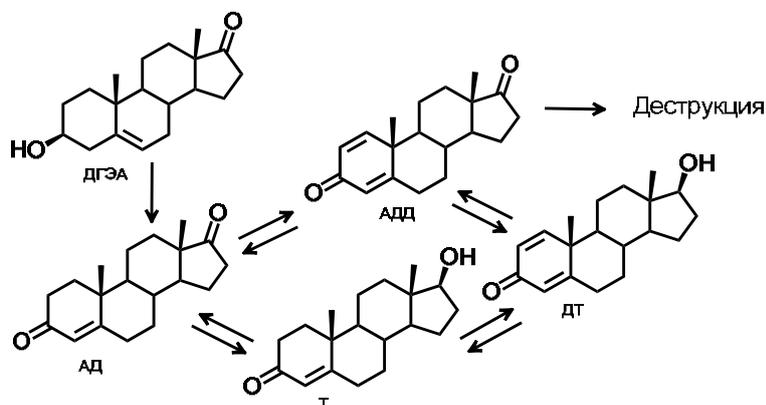


Рис.1. Схема стероидных взаимопревращений при трансформации ДГЭА, АД, АДД и Т штаммом *N. simplex*.

Начальным этапом трансформации ДГЭА (С-19 стероида с 3 β -ол-5-ен-структурой) *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д являлась модификация 3 β -ол-5-ен- в 3-кето-4-ен- структуру с образованием АД, который далее подвергался 1(2)-дегидрированию с формированием основного продукта - АДД. Помимо этого, штамм проводил 17 β -восстановление АДД с накоплением продукта 1-дегидротестостерона (Δ Т) и АД с образованием Т.

При трансформации АД *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д продуктом, образуемым на первом этапе конверсии, являлся Т, который в дальнейшем под воздействием 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы превращался в Δ Т; среди интермедиатов также обнаруживался АДД.

Основным продуктом конверсии Т исследуемым штаммом являлся Δ Т, минорными продуктами были АДД и АД.

При конверсии АДД *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д в трансформационной среде накапливались Δ Т и Т.

Биоконверсия С-21 стероидов, таких как прегненолон, прогестерон, 17-гидроксипрогестерон штаммом *N. simplex* при их концентрации 0.5 г/л характеризовалась полной деструкцией за 24-48 часов инкубации.

Исследование конверсии холевых кислот: литохолевой (ЛХК), дезоксихолевой (ДХК) и холевого (ХК) *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д при их концентрации 0.5 г/л показало, что штамм активно деструктурировал ЛХК и ХК без накопления интермедиатов. ДХК, в отличие от других желчных кислот, слабо трансформировалась и после 6-ти-суток конверсии в среде инкубации оставалось более 50% остаточного субстрата. Среди продуктов трансформации ДХК обнаруживались 12 α -гидрокси-3-оксо-5 β -холановая кислота и 12 α -гидрокси-3-оксо-хол-4-ен-24-овая кислота. Помимо этого, наблюдались другие продукты конверсии ДХК в минорных количествах. Ранее нами были исследованы особенности конверсии желчных кислот (ЛХК, ДХК, ХК) актинобактериями, в том числе, и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д (Kollerov et al., 2013; Deshcherevskaya et al., 2016). Однако осуществление процесса трансформации с использованием бедной среды с глицерином и мочевиной не способствовало биоконверсии ДХК с накоплением продукта с 3-кето-4-ен-структурой (12 α -гидрокси-3-оксо-хол-4-ен-24-овой кислоты) (Deshcherevskaya et al., 2016).

Таким образом, исследование конверсии С-19, С-21 стероидов и холевых кислот растущими клетками *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д показало, что штамм обладает способностью к различным модификациям указанных стероидных соединений.

Знание основ биоконверсии стероидов растущими клетками *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д расширяет представления о его биотехнологическом потенциале и способствует выбору мишеней для генетической инженерии с целью создания эффективных штаммов-биокатализаторов.

Благодарности:

Исследование проводилось в рамках государственного задания ФАНО России (№ 0114-2018-303 0004).

Литература

1. Донова М.В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010, 195 с.
2. Фокина В.В., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Гавриш Е.Ю., Евтушенко Л.И., Донова М.В. (2003) Микробиология. № 1, т. 72, стр. 33-39.
3. Donova MV, Egorova OV (2012) Appl. Microbiol. Biotechnol. 94:1423–1447. doi: 10.1007/s00253-012-4078-0
4. Fokina VV, Donova MV (2003) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 87:319-325. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.10.002
5. Sukhodolskaya G, Fokina V, Shutov A, Nikolayeva V, Savinova T, Grishin Y, Kazantsev A, Lukashev N, Donova M (2017) Steroids 118:9-16. doi:10.1016/j.steroids.2016.11.001
6. Kollerov V.V., Monti D., Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Ferrandi E.E., Larovere A., Gulevskaya S.A., Riva S., Donova M.V. (2013) Steroids 78:370-378.
7. Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Kollerov V.V., Kazantsev A.V., Donova M.V. (2016) J. Mol. Catalysis B: Enzymatic 133:S157-S165.

Благодарим к.б.н. В.Н. Поливцеву (лаборатория цитологии микроорганизмов ИБФМ РАН) за проведение световой микроскопии.

Экспрессия протеазы S273R вируса АЧС в клетках *E.coli* и схема получения растворимого препарата

**Майоров С.Г., Латыпов О.Р., Зражаева Д.С., Холод Н.С., Зайчик Б.Ц.¹,
Шляпников М.Г., Грановский И. Э.**

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

¹ Центр коллективного пользования "Промышленные биотехнологии"
ФИЦ Биотехнологии РАН (Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН)

Вирусные протеазы имеют широкие перспективы применения в различных областях биологических технологий, например, таких как биоинженерия белков *in vitro* или переключение клеточных метаболических путей в синтетической биологии.

Протеаза S273R вируса африканской чумы свиней ответственна за процессинг вирусных коровых белков вириона, которые синтезируются в виде предшественников. Протеаза S273R относится к клану SE цистеиновых протеаз. Она экспрессируется в ходе инфекционного цикла, а также является компонентом кора вириона. Считается, что фермент необходим вирусу не только для процессинга структурных белков, но и для эффективного протекания ранних стадий инфекции. Протеаза S273R является высоко консервативной: идентичность последовательностей протеаз, кодируемых различными изолятами вируса, составляет не менее 96%. Помимо высокой консервативности коровых протеаз, необходимо отметить консервативность сайтов процессинга среди различных

изолятов вируса АЧС На основании анализа известных сайтов расщепления установлено, что протеаза S273R вируса АЧС расщепляет полибелки в последовательности GG-X. Тем не менее, расщепление предшественников происходит не во любых сайтах GG-X, что свидетельствует о недостаточном понимании субстратной специфичности фермента.

Целью данной работы являлось разработка системы экспрессии и схемы очистки фермента для его дальнейшего изучения и возможного практического использования. В качестве хозяина для экспрессии нами была выбрана кишечная палочка. Первоначально, нами была проведена экспрессия в клетках *E.coli* протеазы S273R дикого типа, а также слитой с последовательностью из шести остатков гистидина как на N-, так и на C-конце белка. Экспрессию проводили в штамме *E.coli* Rosetta(DE3), адаптированном для эффективной экспрессии генов млекопитающих, содержащих редко используемые в кишечной палочке кодоны. Во всех случаях, экспрессия приводила к накоплению в клетках белка в денатурированной форме в виде телец включения. Также не увенчались успехом попытки получить растворимый белок при экспрессии протеазы S273R, слитой на N-конце с тиоредоксином.

Для получения нативного белка в растворимой форме была применена стратегия клонирования гена протеазы S273R в одной рамке считывания с шапероноподобным белком. Такую возможность предоставляет плазмидный вектор pTSL, содержащий последовательность белка SlyD *E. coli*. SlyD – это белок из семейства PPI-изомераз, катализирующий пептидил-пролил-cis-trans-изомеризацию – один из самых медленных этапов фолдинга белка. Ген протеазы S273R был клонирован в вектор pTSL таким образом, чтобы его трансляция осуществлялась в одной рамке считывания с OPC *slyD*. Предварительные результаты экспрессии в штамме *E. coli* Rosetta(DE3) выявили накопление белка с М.В. ≈ 32 кДа в растворимой фракции клеточных белков. Была разработана схема очистки препарата белка, включающая четыре стадии: металл-хелатная аффинная хроматография (1), высаливание сульфатом аммония (2), аффинная хроматография на носителе Affi-Gel® Blue (3) и хроматография на катионообменном носителе (4). Применение такой схемы позволило получить препарат протеазы S273R с чистотой более 90% (по результатам электрофоретического анализа), обладающей специфической активностью.

Очищенный препарат был подвергнут масс-спектральному анализу методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF). Результаты этого анализа показали, что при экспрессии в клетках *E. coli* происходит автокаталитическое расщепление целевого белка: в последовательности рекомбинантной протеазы S273R стартовому метионину природного белка предшествуют два аминокислотных остатка, глицин и серин. Очевидно, это связано с наличием в аминокислотной последовательности линкера между SlyD и S273R повторяющихся остатков глицина. Поскольку вирусная протеаза S273R гидролизует субстраты в сайте GG-X, это предположительно и обуславливает автокатализ.

Таким образом, нами разработана эффективная система экспрессии в клетках *E. coli* и эффективная схема получения очищенного препарата протеазы S273R, позволяющая проводить дальнейшие биохимические и структурные исследования этого фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08010.

Влияние биоэнергетических характеристик метаболизма клеток на выход биомассы из субстрата

Минкевич И.Г.

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

Важной задачей биохимии и физиологии микроорганизмов является выяснение взаимосвязи между функционированием целостных клеток на этих двух уровнях их организации. Огромная информация о биохимических реакциях, накопленная в литературе и базах данных, должна быть полезна для развития знания о клетке как целом. Одно из направлений применения биохимических знаний в физиологии и биотехнологии – предсказание величины выхода сухого вещества биомассы клеток из субстрата-источника восстановленности на основе знания путей его метаболизации.

В работе [1] нами предложено разделение целостного метаболизма на парциальные (частные) обмены, связанные с образованием и использованием клетками макроэргических связей (МЭС) в носителях МЭС — АТФ, GTP и др. Выделен конструктивный обмен как совокупность реакций, превращающая субстрат в вещество биомассы и требующая вложения энергии в форме МЭС. Конструктивный обмен, в свою очередь, был разделен на две части: 1) передний конструктивный обмен, существенно зависящий от вида субстрата и образующий на своем выходе стандартные соединения, названные узловыми метаболитами [1], и 2) стандартный конструктивный обмен, превращающий узловые метаболиты в макромолекулы биомассы, одинаковый в клетках организмов различных видов.

В данной работе эта концепция использована для анализа баланса парциальных обменов и предсказания на этой основе максимальных значений выхода биомассы на различных субстратах, являющихся источниками вещества и энергии для роста. Этот теоретический анализ проведен, используя сформулированные нами математические уравнения баланса количества веществ и количества их восстановленности в ходе функционирования различных парциальных обменов. При вычислении баланса МЭС использован разработанный нами пакет компьютерных программ GenMetPath (генератор метаболических путей), синтезирующий различные варианты путей, осуществляющих конверсию субстрата в узловые метаболиты. Эта конверсия рассматривается в данной работе не для каждого узлового метаболита по отдельности, а для всей их совокупности.

Задача предсказания величины выхода биомассы разделена на две части. 1) Определение расхода МЭС на синтез вещества биомассы клеток из узловых метаболитов в ходе стандартного конструктивного обмена. 2) На основе параметров баланса переднего метаболизма и стандартного конструктивного обмена находится искомое теоретическое значение выхода биомассы на данном субстрате.

Ввиду очень большого числа реакций, входящих в стандартный конструктивный обмен, и возможной неполноты баз данных расход МЭС на синтез биомассы из узловых метаболитов найден на основе стабильного максимального выхода биомассы различных микроорганизмов из глюкозы (50% по массе) и стабильной степени восстановленности биомассы организмов, не являющихся сверхсинтетиками липидов. Для этого сформулирован метод выделения конструктивного обмена из полного метаболизма, основанный на следующих экспериментально найденных фактах [2]: содержание липидов в клетках, не способных к их сверхсинтезу, стабильно и близко к 10% от сухой биомассы; восстановленность и содержание углерода в липидной и безлипидной частях биомассы весьма стабильны. Исходя из этого, сформулирован принцип выделения конструктивного обмена на глюкозе на основе совместно записанных балансов углерода и восстановленности. Определено количество МЭС, образованных передним метаболизмом (полный метаболизм минус стандартный конструктивный обмен) при росте на глюкозе. Это же количество МЭС потребляется стандартным конструктивным обменом. Исходя из этого, вычислены затраты МЭС на синтез биомассы. Найдено, что вариации потоков через узловые метаболиты, происходящие в весьма широких пределах, мало влияют на эту величину. Она равна 0.89 молей АТФ на эквивалент редоксонов (единиц восстановленности) биомассы, или, в иных единицах, 0.14 молей АТФ на 1 г сухой биомассы. Разброс этой величины составляет 3.2% от среднего. Наряду с этим, найдено

также общее количество NADPH, которое потребляет стандартный конструктивный обмен вместе с узловыми метаболитами.

Потребление макроэргических связей стандартным конструктивным обменом является ключевым параметром для теоретического предсказания величины выхода биомассы на субстратах, первичный метаболизм которых, превращающий эти субстраты в узловые метаболиты, известен. Эффективным инструментом для этого является GenMetPath — разработанный нами пакет компьютерных программ на основе матричного описания стехиометрии множества биохимических реакций.

Литература

1. Minkevich I. G. The Effect of Cell Metabolism on Biomass Yield during the Growth on Various Substrates. // Computer Research and Modeling. — 2017. — Vol. 9. — No. 6. — P. 993–1014.
http://crm.ics.org.ru/uploads/crmissues/crm_2017_6/2017_06_11.pdf
2. Minkevich I. G., Dedyukhina E. G., Chistyakova T. I. The effect of lipid content on the elemental composition and energy capacity of yeast biomass. // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2010. — Vol. 88. — No. 3. — P. 799–806.

Испытание препарата изолимонной кислоты в модели окислительного стресса, индуцированного тяжелыми металлами на инфузории *Paramecium caudatum*

¹Моргунов И.Г., ¹Камзолова С.В., ¹Самойленко В.А., ²Карпухина О.В., ²Иноземцев А.Н.

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, morgunovs@rambler.ru

²МГУ им. Ломоносова, биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности,
г. Москва

Тяжелые металлы вызывают чрезмерную активацию процессов свободно-радикального окисления, которые вызывают денатурацию белков, повреждение нуклеиновых кислот, инициацию перекисного окисления липидов, повреждение клеточных мембран. После контакта клеток с тяжелыми металлами их метаболизм, в первую очередь, зависит от наличия антиоксидантов (глутатион, α -токоферол, аскорбиновая кислота и др.), а также активности ряда ферментов (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза) [1-3].

Поиск новых веществ, действие которых направлено на нормализацию метаболических процессов, на блокаду свободно-радикальных процессов в клетке является важным аспектом в исследованиях механизмов адаптации организмов к воздействию токсических соединений.

Целью данного исследования явилась оценка влияния изолимонной кислоты (ИЛК) в модели окислительного стресса, индуцированного действием солей тяжёлых металлов на инфузории *Paramecium caudatum*.

Процесс наработки препарата ИЛК включает две стадии: (1) ферментация с использованием специально-селекционированного продуцента ИЛК – штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373; (2) выделение ИЛК из культуральной среды и очистка до фармакопейной чистоты. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол. На 144 ч в среде накапливалось 70 г/л ИЛК. Выход ИЛК ($Y_{\text{ИЛК}}$) составлял 0,70 г/г потребленного этанола. В качестве побочного продукта ферментации накапливалась лимонная кислота (ЛК) – 23 г/л, селективность процесса составила 75%, соотношение ИЛК:ЛК составляло 3:1. ИЛК в виде монокалийевой соли выделена из культуральной жидкости в виде кристаллов и очищена до чистоты 99,9%. Подробно метод выделен изложен [4].

Тестирование препарата ИЛК проводили на клетках инфузорий *Paramecium caudatum*. Для оценки влияния ИЛК на окислительный стресс, парамеции выращивали на среде Лозина–Лозинского. Для индукции окислительного стресса использовали соли тяжёлых металлов Cu, Pb, Zn, Cd в концентрации 10 мкМ. Клетки, взятые в поздней логарифмической фазе роста, инкубировали с токсикантами при температуре 24 °С, рН = 6,8-7,0. Число клеток в 10 мл среды, содержащей интактную культуру инфузорий, служило контролем. Чувствительность инфузорий к токсичным веществам определяли по времени их гибели, которую фиксировали по прекращению движения простейших, часто сопровождающемуся деформацией и лизисом клетки. Подсчет клеток осуществляли под микроскопом в счетной камере Горяева. Для предотвращения развития процессов свободно-радикального окисления, вызванных действием токсичных веществ, клетки инфузорий предварительно инкубировали в среде, содержащей ИЛК (в концентрации от 0,5 до 10 мМ), а также для сравнения использовали общепринятый антиоксидант - аскорбиновую кислоту. Предварительная выдержка клеток инфузорий с ИЛК составляла 45 мин.

В ходе выполнения работы установлено, что по токсическому действию на цитоплазматическую мембрану *P. caudatum* ионы металлов можно расположить в следующий ряд: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. При экспозиции солей цинка, кадмия, меди и свинца в течение 120 мин остаются жизнеспособными 73,5%; 44,9%, 41,8% и 53,1% парамеций, соответственно.

Опыты по выживаемости *P. caudatum* после внесения в среду тяжелых металлов Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} на фоне предварительной инкубации клеток с ИЛК или аскорбиновой кислоты (в течение 45 мин) выявили следующие особенности:

1. Преобработка клеток с 0,5 мМ ИЛК не оказала позитивного влияния в ответ на негативное действие ионов Cu^{2+} . Повышение концентрации ИЛК с 0,5 до 10 мМ приводило к увеличению выживаемости инфузорий на 64% по сравнению с контролем.
2. Преобработка клеток с 0,5 мМ ИЛК оказала позитивное влияние в ответ на негативное действие ионов Pb^{2+} : выживаемость инфузорий увеличилась на 35,5%. Дальнейшее повышение концентрации ИЛК до 10 мМ приводило к увеличению выживаемости инфузорий на 65% в среде с Pb^{2+} .
3. Преобработка клеток с 0,5 мМ ИЛК или аскорбиновой кислоты практически не влияла на выживаемость клеток в условиях окислительного стресса, индуцированного солями кадмия и цинка, в то время как повышение концентрации ИЛК с 0,5 до 10 мМ приводило к увеличению выживаемости инфузорий на 116% в среде с Cd^{2+} и на 95% в среде с Zn^{2+} .
4. Эффект аскорбиновой кислоты оказался неоднозначным: аскорбиновая кислота оказывала антиоксидантное действие при концентрациях от 0,5 до 2,5 мМ (выживаемость в среднем увеличивалась до 27,5%), а при 5 мМ и 10 мМ эффект аскорбиновой кислоты был прооксидантным. Известно, что существует явление инверсии антиоксидантного действия аскорбиновой кислоты в прооксидантное. Основными факторами, определяющими инверсии антиоксидантных свойств, является концентрация самого антиоксиданта и наличие в реакционной среде катионов металлов переходной валентности [5]. В данном эксперименте с солями таких металлов, как Cu, Pb, Cd и Zn увеличение концентрации аскорбиновой кислоты привело к снижению её антиоксидантного эффекта.

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что ИЛК оказалась эффективным протектором от воздействия тяжелых металлов у одноклеточных организмов. Установлена зависимость положительного эффекта ИЛК от дозы, она проявляет наиболее значимый эффект в концентрации 10 мМ и по протективному действию превосходит классический антиоксидант – аскорбиновую кислоту. Поскольку основным механизмом нейротоксического эффекта тяжёлых металлов является окислительный стресс, то указанное положительное влияние ИЛК может, на наш взгляд, служить подтверждением наличия антиоксидантных свойств в спектре фармакологической активности ИЛК.

Литература

1. Karpukhina O.V. et al. The effect of antioxidant compounds on oxidative stress in unicellular aquatic organisms // In: Materials Science and Engineering, Volume II: Physiochemical Concepts, Properties, and Treatments; Zaikov, G.E., Hagli, A.K., Klodzinska, E., Eds.; Publisher: Apple Academic Press, 2014, pp. 323-329.
2. Jan A.T. et al. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants // Int. J. Mol. Sci. – 2015.- V. 16. – P. 29592-29630.
3. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017. – V. 482. – P. 419-425.
4. Morgunov I.G. et al. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum* // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2018. – V. 48(1). – P. 1-5.
5. Podmore I.D. et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties // Nature – 1998. V. 392. – P. 559.

Эффективность промоторов *B. cereus* ATCC4342, контролируемых системой quorum sensing PlcR-PapR

Нагель А.С., Казанцева О.А., Кузницын Р.А., Шадрин А.М.

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

Большинство внеклеточных факторов патогенности микроорганизмов группы *Bacillus cereus* контролируется генами *plcR* и *papR*, кодирующими транскрипционный регулятор PlcR и пептид PapR, соответственно. Основная функция PlcR заключается в регуляции транскрипции генов, кодирующих факторы патогенности у микроорганизмов группы *Bacillus cereus*. PapR – это матрично синтезируемый пептид длиной в 44 аминокислотных остатка, который в зрелой форме представляет собой гепта- или пентапептид, способный специфически взаимодействовать с молекулой PlcR, вызывая изменения в его конформации, необходимые для специфического взаимодействия с ДНК.

Микроорганизмы группы *Bacillus cereus*, к которой относят несколько видов близкородственных бацилл, широко распространены в природе и часто встречаются в почве. Недавно *B. cereus* были обнаружены на международной космической станции.

PlcR способен активировать транскрипцию более половины генов токсинов *Bacillus cereus*, которые служат основными причинами развития множества заболеваний и пищевых отравлений.

Для анализа эффективности промоторов, контролируемых PlcR-PapR в *Bacillus cereus* были созданы рекомбинантные штаммы *Bacillus subtilis* (не являются патогенными), содержащие интегрированную в хромосому систему quorum sensing *plcR-papR* и плазмиды с репортерным геном *egfp* под контролем регулируемых quorum sensing промоторов и был проведен сравнительный анализ экспрессии eGFP.

В данной работе мы представляем анализ транскрипционной активности PlcR-зависимых промоторов *in vivo*, в зависимости от стадий роста культуры.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01017

Индукция синтеза карбогидраз гриба *Penicillium verruculosum* гентибиозой

Немашкалов В.А., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, vnemashkalov@gmail.com

У микроорганизмов–продуцентов карбогидраз целлюлоза является общим индуктором синтеза ферментов целлюлазно-ксиланазного комплекса. Однако целлюлоза нерастворима и поэтому не способна проникать непосредственно в клетки. Известно, что в клетки способны проникать только растворимые олигосахариды (целлобиоза, лактоза, софороза, гентибиоза и др.), которые и индуцируют синтеза целлюлаз [1]. Например, для грибов рода *Trichoderma*, наиболее широко используемых в качестве продуцентов целлюлаз, показано, что таким индуктором является дисахарид софороза [2], а для гриба *P. purpurogenum* показана индуцирующая роль дисахарид гентибиозы [3].

Ферментные препараты, полученные с помощью гриба *P. verruculosum*, характеризуются высоким содержанием β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21) – фермента, катализирующего гидролиз олигосахаридов [4], а при некоторых специальных условиях и обратной реакции – конденсации глюкозы с образованием смеси дисахаридов.

Таким образом, основной задачей было исследование индуцирующей роли гентибиозы для гриба *P. verruculosum*, а также замена основного дорогостоящего компонента ферментационной среды – микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) на смесь продуктов реакции поликонденсации глюкозы (ПКФД).

На первом этапе работы мицелий гриба *P. verruculosum* был выращен на среде PV, г/л (KH₂PO₄ -15.0, (NH₄)₂SO₄- 5.0, MgSO₄ x 7H₂O – 0.3, CaCl₂ x 2H₂O - 0.3, дрожжевой экстракт - 0.5, глицерин -10.0) в течение 36 часов при 32°C. Затем мицелий центрифугировали, дважды промывали KH₂PO₄ – буфером pH 6.0 ресуспендировали в среде для индукции (1-2 мг/мл мицелия). Среду для индукции готовили в 50 мМ KH₂PO₄ – буфере pH 6.0, добавив в него (NH₄)₂SO₄ – 1.4, MgSO₄ – 0.3, Твин-80 – 2.0 и тестируемый сахар – 2 г/л. Смесь инкубировали в течение 48 час, отбирали пробы и измеряли активность ферментов КМЦ-азы, ксиланазы и β-глюкозидазы. Результаты представлены на рис. 1.



Рис. 1. Индукция гентибиозой внеклеточных карбогидраз гриба *P. verruculosum*.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что гентибиоза обладает ярко выраженным индуцирующим действием, увеличивая синтеза КМЦ-азы в среднем в 4 раза, ксиланазы - в 3 раза, β-глюкозидазы - в 1,5 раза. В варианте «без добавок» синтез карбогидраз практически не наблюдался.

На следующем этапе была осуществлена реакция поликонденсации с помощью ферментного препарата *P. verruculosum*, в результате чего получена смесь (ПФКД), содержащая, помимо других дисахаридов, гентибиозу (~53%) [5]. Эта смесь была использована в качестве индуктора карбогидраз при культивировании гриба *P. verruculosum*. Культивирование проводили в 1-литровых ферментерах на среде, содержащей в качестве основного индуктора ферментов (в контрольном варианте), 40 г/л микрокристаллической целлюлозы (МКЦ). В трех опытных вариантах 25, 50 и 100% МКЦ было заменено на смесь ПКФД (Рис. 2).

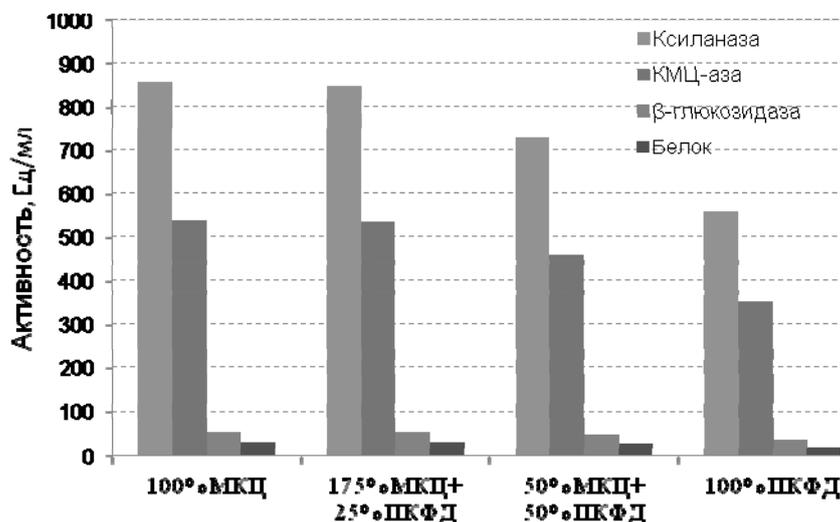


Рис. 2. Ферментативные активности, полученные при культивировании гриба *P. verruculosum* на средах с разным содержанием МКЦ и смеси ПФКД

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, замена 1/3 МКЦ не приводит к снижению ферментативных активностей, при замене 2/3 МКЦ наблюдается снижение активностей примерно на 15%, а при полной замене МКЦ на смесь ПФКД – до 35%. Таким образом, смесь ПФКД, полученная из глюкозы с помощью β-глюкозидазного ферментного препарата гриба *P. verruculosum*, может являться альтернативой дорогостоящему компоненту питательной среды - МКЦ, обеспечивающим высокий уровень синтеза внеклеточных карбогидраз.

Литература

1. Amore A. et al. Regulation of cellulose and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr. Genomics* 2013, v.14, p.230-249.
2. Sternberg D., Mandels G.R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 1979, v.139, p.761-769.
3. Kurasawa T. et al. Induction of cellulose by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, v.58, p. 106-110.
4. Соловьева И.В. и др. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз. *Микробиология*, 2005, т.74, №2, с.172-178
5. Semenova M.V. et al. Disaccharide synthesis by enzymatic condensation of glucose: glycoside linkage patterns for different fungal species. *Open Glycoscience* 2009, 2, p. 20-24.

Оптимизация условий культивирования грибного штамма *Penicillium verruculosum* F10, продуцента β -глюкозидазы

Немашкалов В.Н., Бубнова Т.В., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Сеницын А.П.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино, vnemashkalov@gmail.com

В настоящее время проблема ферментативной конверсии целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ), реализуемой в различных биотехнологических процессах, является весьма актуальной. В этих процессах ЦСМ подвергаются ферментативному гидролизу с использованием комплекса целлюлаз, в результате чего образуется глюкоза, которую затем может быть трансформирована в различные полезные продукты (органические кислоты, спирты, эфиры и пр.). Одним из ключевых компонентов целлюлазного комплекса, осуществляющего биодegradацию ЦСМ, является β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) [1]. Однако не у всех микроорганизмов-деструкторов целлюлозы β -глюкозидаза синтезируется на достаточно высоком уровне. Так, грибы рода *Trichoderma*, известные как мощные продуценты целлюлаз, имеют слабую активность β -глюкозидазы, и поэтому в производственных процессах этот фермент приходится добавлять дополнительно [2].

Таким образом, целью настоящего исследования была оптимизация параметров ферментационного процесса для максимальной продукции целевого фермента, а также количественного содержания дорогостоящего компонента питательной среды - микрокристаллической целлюлозы (МКЦ).

Периодическое глубинное культивирование штамма *P. verruculosum* F10 проводили на ферментационной установке «КФ-108», оснащенной четырьмя 1-литровыми ферментерами. Питательная среда содержала МКЦ, дрожжевой экстракт, пшеничные отруби, минеральные соли. Длительность процесса – 144 ч.

Традиционными параметрами культивирования гриба *P. verruculosum* являются Т 32°C, рН – 5,0, содержание в среде МКЦ – 60 г/л. Для определения оптимальных параметров для нового штамма F10 - продуцента β -глюкозидазы был взят диапазон температур 28°– 40°C, диапазон рН - 2,0 – 8,0. Результаты представлены на рис. 1А и 1Б. Активность β -глюкозидазы и содержание белка в культуральной жидкости приведены в процентном отношении от максимальных значений – 1200 Ед/мл β -глюкозидазы и 15 мг/мл белка.

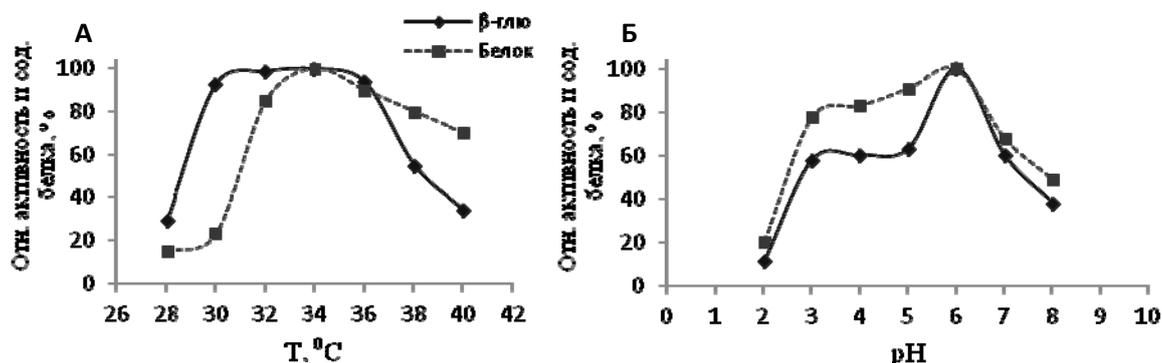


Рис. 1. Зависимости активности β -глюкозидазы и содержания белка от температуры (А) и рН (Б)

Содержание МКЦ (основного индуктора ферментов) в составе стандартной ферментационной среды для культивирования гриба *P. verruculosum* является 60 г/л. Такое высокое содержание компонента существенно удорожает стоимость конечного продукта (ферментного препарата). Поэтому с целью снижения затрат на получение целевого белка было проведено исследование влияния количества МКЦ на биосинтез β -

глюкозидазы. Эксперимент проводили в ферментерах при стандартных условиях T 32°C, рН – 5.0 и различных концентрациях МКЦ. В конце ферментации в культуральной жидкости (КЖ) измеряли активность β -глюкозидазы и общее содержание белка (Рисунок 2).

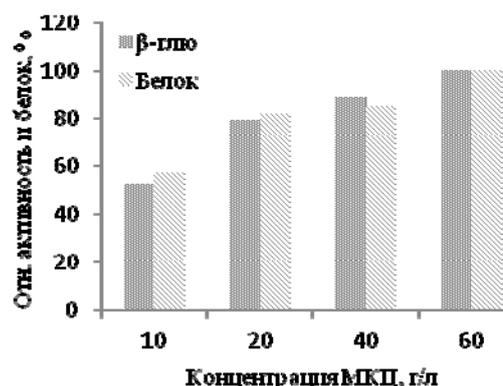


Рис. 2. Зависимость активности β -глюкозидазы и содержания белка в КЖ от концентрации МКЦ в среде

Выводы:

1. Температурный диапазон для достижения максимальной активности β -глюкозидазы находится в широком диапазоне – от 30 до 36°C. Дальнейшее повышение температуры приводит к резкому снижению активности (Рисунок 1А);
2. Оптимальным значением рН ферментационной среды для продуцента β -глюкозидазы является 6.0 (1Б), тогда как для исходного штамма - 5.0 [3].
3. Снижение концентрации МКЦ в составе стартовой ферментационной среды на 2/3 приводит к незначительному снижению активности целевого фермента (~10%), что, безусловно, является целесообразным с точки зрения экономики технологического процесса получения β -глюкозидазного ферментного препарата.

Литература

1. Elliston A. et.al. Biorefining of waste paper biomass: increasing the concentration of glucose by optimizing enzymatic hydrolysis. // Appl Biochem Biotechnol. – 2014. – V.172. – №7. – p. 3621-34.
2. Ramani G. et.al. Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. // Appl Biochem Biotechnol. – 2012. – V.167. – №5. – p. 959-72.
3. Соловьёва И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В. и др. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз. // Микробиология. – 2005. – Т.74. – №2. – с. 1–7.

Психрофильные метаногенные археи из вечной мерзлоты Арктики

Ошуркова В.И.,¹ Ривкина Е.М.,² Щербакова В.А.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

² Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
г. Пущино, oshurkova.vikrtoriya@gmail.com

В настоящее время пристальное внимание уделяется исследованиям в области микробной экологии холодных экосистем, по своей структуре представляющей большой массив новых и часто некультивируемых психрофильных и психроактивных таксонов с

уникальными свойствами, чей потенциал может иметь большое значение в биогеохимических процессах Земли.

Арктика играет важную роль в формировании климата Земли и балансе парниковых газов в атмосфере, поскольку является источником биогенного метана, часть которого законсервирована в толщах многолетнемерзлых отложений, которые никогда не оттаивали после замерзания. Исследования многолетнемерзлых грунтов привели к описанию четырех штаммов мезофильных метаноархей [1, 2, 3, 4]. На данный момент известен только один облигатный психрофильный метаноген *Methanogenium frigidum* [5], обитающий в антарктическом озере.

Криопэги – уникальная экологическая ниша, которая представляет собой высокоминерализованные линзы воды, обнаруживаемые в толщах мерзлых пород Арктики. Исследованиями российских и зарубежных ученых показано, что в криопэгах обитают галофильные и галотолерантные микроорганизмы: психрофильные и психротолерантные анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии и эукариоты, однако многочисленные попытки выделить метанобразующих архей из этих экониш до сих пор были не успешными.

Впервые из экосистем многолетнемерзлых отложений Арктики, характеризующихся постоянной отрицательной температурой, выделены и частично охарактеризованы новые психрофильные метаногены. Чистая культура штамма VI была получена путем длительного культивирования при температуре 8-10°C образца криопэга, отобранного на полуострове Варандей (побережье Баренцева моря). Морфологически ее клетки представлены неправильными кокками. Клетки штамма MT1, выделенного из образца вечной мерзлоты на полуострове Мамонта (побережье Карского моря), представляли собой изогнутые палочки. Изучены физиолого-биохимические и филогенетические характеристики изолятов и получены убедительные доказательства того, что выделенные метанобразующие археи представляют собой новые таксоны порядка *Methanomicrobiales*. Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 18-34-00334 мол_a).

Литература

1. Rivkina, E., Shcherbakova, V., Laurinavichius, K., Petrovskaya, L., Krivushin, K., Kraev, G., Pecheritsina S., Gilichinsky, D. (2007). Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. *FEMS microbiology ecology*, 61(1), 1-15.
2. Krivushin, K. V., Shcherbakova, V. A., Petrovskaya, L. E., Rivkina, E. M. (2010). *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(2), 455-459.
3. Shcherbakova, V., Rivkina, E., Pecheritsyna, S., Laurinavichius, K., Suzina, N., Gilichinsky, D. (2011). *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(1), 144-147.
4. Wagner, D., Schirmack, J., Ganzert, L., Morozova, D., & Mangelsdorf, K. (2013). *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation-and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(8), 2986-2991.
5. Franzmann, P. D., Liu, Y., Balkwill, D. L., Aldrich, H. C., De Macario, E. C., & Boone, D. R. (1997). *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1068-1072.

Вклад бактерий в поглощение микроэлементов бентонитом

Переломов Л.В.¹, Сизова О.И.²

¹ Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, г. Тула

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пущино, osizova@rambler.ru

Биогеохимические циклы микроэлементов в природных и антропогенных биокосных системах (почвах, грунтах, илах, биофильмах и др.) определяются составом и свойствами отдельных минеральных, органических и биотических компонентов таких систем, а также сложными взаимодействиями между ними. Высокая скорость размножения и большое соотношение площади поверхности клеток к их объему делает микроорганизмы определяющими участниками биогеохимических циклов элементов. Основным процессом взаимодействия микроорганизмов с микроэлементами, имеющими биогеохимическое значение является биосорбция. Под биосорбцией понимают связывание металлов на поверхности бактериальных клеток (White et al., 1995), которое происходит, в основном, по механизмам ионного обмена, хелатообразования и адсорбции. Глинистые минералы, в свою очередь, являются основополагающими компонентами большинства биокосных систем, в первую очередь - почв, и в значительной степени контролируют подвижность и биологическую доступность соединений элементов в наземных экосистемах. Особенности кристаллохимического строения бентонита, относящегося к трехслойным минералам, обуславливает наличие на его поверхности большого количества ионообменных катионов, достаточно сильно влияющих на физико-химические свойства минерала.

В нашей работе было изучено поглощение свинца и меди кальциевым бентонитом, живыми и разрушенными клетками грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, а также в системах, включающих минеральный и один из биотических компонентов в диапазоне концентраций элементов 25-250 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение величин адсорбции Pb и Cu в диапазоне концентраций 25-250 мкМ бентонитом, а также живыми и разрушенными клетками свидетельствует о том, что биологический материал является более эффективным сорбентом (на порядок и более). Поглощение микроэлементов снижается в ряду:

Pb: живые клетки > обломки клеток > бентонит

Cu: обломки клеток > живые клетки > бентонит

Результаты нашего эксперимента подтверждаются литературными данными. Так специальные многокомпонентные системы (Partitioning in Geobiochemical Systems, PIGS) были использованы для сравнения поглощения металлов различными почвенными компонентами: бактериями, грибами, торфом, глинами и оксидом алюминия в присутствии и отсутствии фульвокислот (Ledin et al., 1996). Результаты показали, что даже тогда, когда микроорганизмы присутствовали в небольших количествах в составе твердой фазы, они вносили значительный вклад в поглощение металлов.

Мы исследовали поглощение свинца и меди бентонитом в присутствии живых и разрушенных клеток бактерий при исходной pH 5 сорбционного раствора. В присутствии живых и разрушенных клеток микроорганизмов поглощение микроэлементов из сорбционного раствора значительно возрастает. Для свинца (Рисунок 1) максимальное поглощение наблюдается в системе, состоящей из бентонита и живых клеток. При концентрациях раствора 25-100 мкМ значения поглощения в присутствии клеток и их обломков близки, но при более высоких концентрациях поглощение в присутствии клеток существенно больше. Это может быть результатом формирования новых сорбционных центров под воздействием живых клеток.

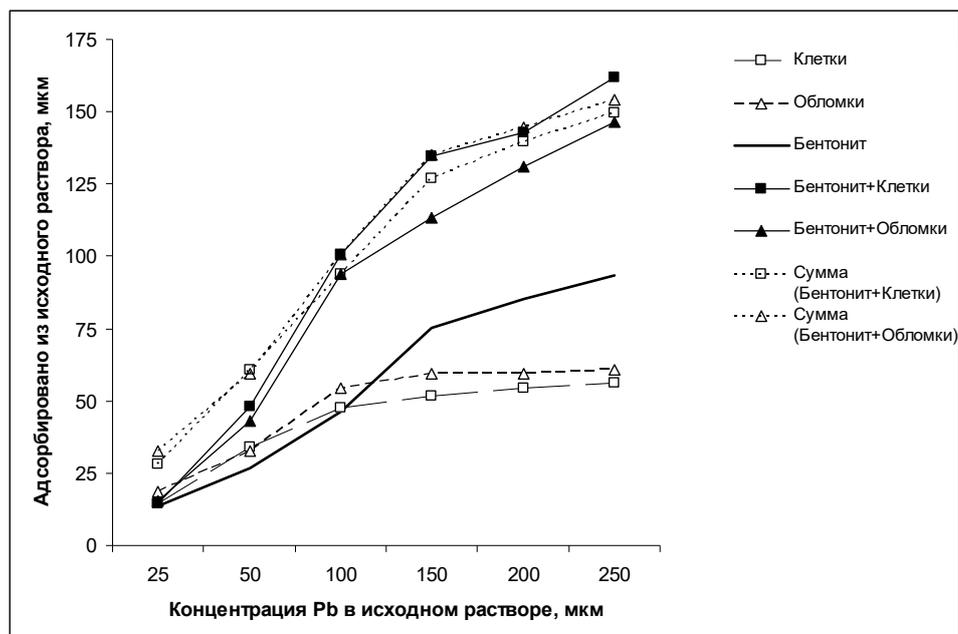


Рис. 1. Поглощение свинца бентонитом и другими компонентами раствора

Поглощение меди в присутствии живых и разрушенных клеток бактерий по сравнению с одним бентонитом увеличивалось при концентрациях выше 50 мкм и росло с увеличением концентрации элемента в растворе. Эффект живых клеток и их обломков на поглощение микроэлемента был практически одинаков. Однако расчетное суммарное поглощение меди бентонитом и биологическим материалом, в целом, превосходило экспериментальные данные как для живых клеток (в меньшей степени), так и для обломков клеток (в большей степени). Такое снижение поглощения меди можно объяснить взаимодействием клеток и органического материала с бентонитом и маскировкой или нейтрализацией в результате этого сорбционных позиций. Walker соавторами (1989) были получены аналогичные результаты для широкого спектра катионов микроэлементов. В их экспериментах ёмкость поглощения органо-минеральными системами составляла 20-90 % от количества аддитивно рассчитанного поглощения металлов индивидуальными компонентами. Маскировка сорбционных центров органическими остатками бактерий была подтверждена авторами методами трансмиссионной электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Таким образом, наши исследования еще раз подтверждают, что микроорганизмы являются активными участниками биогеохимических циклов микроэлементов за счет их биосорбции. В трёхкомпонентных биокосных системах, включающих бентонит и клетки бактерий или бентонит и обломки клеток, происходит увеличение поглощения изученных микроэлементов по сравнению с бентонитом.

Литература

1. White C., Wilkinson S.C., Gadd G.M. (1995) The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 35(1-3), 17-40.
2. Ledin M., Krantz-Rulcker C., Allard B. (1996) Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. *Soil Biol. Biochem.* 28 (6), 791-799.
3. Walker S.G., Flemming C.A., Ferris F. G., Beveridge T.J., Bailey G.W. (1989) Physicochemical interaction of *Escherichia coli* cell envelopes and *Bacillus subtilis* cell walls with two clays and ability of the composite to immobilize heavy metals from solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2976-2984.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00274.

Параметры электрохимического глюкозного биосенсора при иммобилизации фермента в полиэлектролитные капсулы

Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н.

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

Создание биосенсоров и биотопливных элементов неразрывно связано с поиском и совершенствованием методов иммобилизации биокатализатора на поверхности электродов. Иммобилизация должна быть осуществлена таким образом, чтобы биокатализатор находился длительное время в активном состоянии. Известен способ сохранения активности ферментов на высоком уровне с помощью капсулирования [1, 2]. Так, ферменты иммобилизуют в капсулы из различных материалов, таких как липосомы, полимеры, золь-гели или гидрогели в зависимости от задач исследования. Применение для иммобилизации ферментов метода послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов не препятствует проницаемости низкомолекулярных соединений к ферментам, и в то же время, капсулы непроницаемы для высокомолекулярных веществ – что позволяет использовать их в качестве микроконтейнеров и микрореакторов в фармацевтической, косметической, пищевой, текстильной и сельскохозяйственной промышленности.

Целью данной работы являлось оценка параметров электрохимического биосенсора для определения глюкозы при иммобилизации глюкозооксидазы на поверхности электрода с помощью полиэлектролитных капсул.

В качестве основы биосенсора использовали электроды 3-контактные, полученные матричной печатью (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия). Осаждение берлинской лазури на поверхность электродов проводили из реакционной смеси состава: 0.1 М FeCl₃ и 0.1 М K₃[Fe(CN)₆] в фоновом электролите 0.1 М KCl, 0.1 М HCl [3]. Использовали глюкозооксидазу из *Aspergillus niger*, с активностью 185000 U/г/. Получение полиэлектролитных микрокапсул (ПМК) со встроенной глюкооксидазой проводили согласно [4]. 5 мкл полиэлектролитных капсул наносили на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода, подсушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут. Концентрация фермента на поверхности электрода составляла 139 мкг/см². Между измерениями готовые биосенсоры хранили при температуре 4°C в темноте. Измерения выполняли при температуре 200 С в кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании. pH, молярность и концентрацию NaCl в буферном растворе варьировали.

В ходе исследования были получены сигналы биосенсора в буферных растворах со значением pH от 5.5 до 8.0. Максимальные величины амплитуд ответов биосенсора наблюдали в области значений 5.5 - 6.0. При исследовании зависимости сигналов биосенсора от молярности буфера наблюдали колоколообразную зависимость амплитуды от величины молярности; максимум получали при концентрации буферного раствора в 30-40 мм. Было показано, что ионы калия оказывают более отрицательный эффект на сигналы биосенсора: увеличение концентрации ионов натрия выше уровня 30 мМ ведет к падению величины сигналов биосенсора на ~10 %, а в случае совместного увеличения концентрации ионов калия и натрия выше уровня 30 мМ падение сигнала биосенсора составляет ~44 %.

Зависимости сигналов биосенсора от концентрации глюкозы приведены на рис. 1, кривая 1. В таблице приведены значения основных параметров биосенсора. Также в таблице и на рисунке 1 приведены изменения параметров биосенсора при хранении. Таким образом, капсулирование помогает сохранять активность глюкозооксидазы на

достаточно высоком уровне в течение длительного времени, что согласуется с данными для другим ферментов, например для уреазы [5].

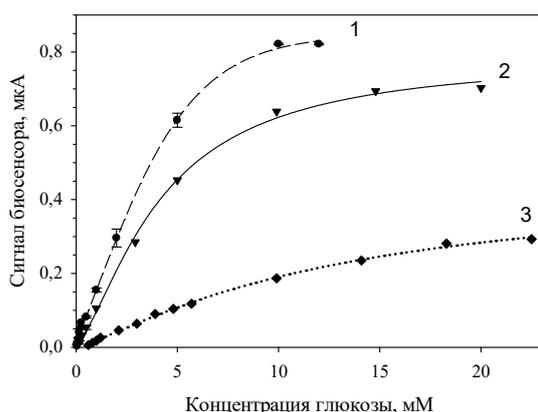


Рис. 1. Изменение зависимости сигналов биосенсора от концентрации глюкозы при хранении: 1 – в первые сутки; 2 – через 5 месяцев; 3 - через 8 месяцев

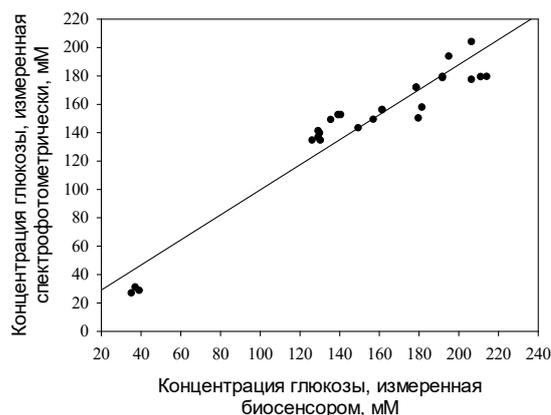


Рис. 2. Графическая корреляция данных, полученных спектрофотометрическим и биосенсорным методами измерения глюкозы в реальных образцах

Табл. Изменение основных параметров калибровочной зависимости при хранении ферментного биосенсора

Параметр	Иммобилизация в полиэлектролитные капсулы		
	1-е сутки	ч/з 5 месяцев	ч/з 8 месяцев
V_{max} , мкА	1.069	0.775	0.445
K_M , мМ	4.071	4.142	12.641
h	1.223	1.485	1.228
Уровень сигнала, %	100	74	17

Полученный биосенсор был протестирован на реальных образцах сока и алкогольных напитков. Результаты измерений сравнивали с данными стандартного метода определения глюкозы с помощью спектрофотометрии. Коэффициент корреляции данных между измерениями, сделанными биосенсором и стандартным методом, составляет 0.92 (рис. 2).

Таким образом, капсулирование позволяет увеличить срок службы биосенсора и поддерживать активность фермента на высоком уровне. Такие биосенсоры могут быть использованы в медицине для анализа крови на содержание глюкозы, а также для тестирования соков и детского питания. Прочное удерживание капсул на поверхности графитового электрода позволяет получить биосенсор многократного использования, что делает его экономически выгодным и конкурентоспособным среди других методов определения глюкозы. Кроме того, проведенное исследование закладывает основы для расширения метода капсулирования не только на ферменты, но и целые клетки для последующего использования в биосенсорах и биотопливных элементах.

Литература

1. Сухоруков Б.И., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А., Дубровский А.В., Дыбовская Ю.Н., Шабарчина Л.И. // Биофизика. 2007. Т. 52. № 6. С. 1041-1048.
2. Тихоненко С.А., Сабурова Е.А., Дубровский А.В., Шабарчина Л.И., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б. И. // Физика и химия стекла. 2007. Т. 33. № 3. С. 399-408.

3. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E. // Anal. Lett. 1994. T. 27. № 15. С. 2861-2869.
4. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 3. P. 918-925.
5. Reshetilov A.N., Plekhanova Yu.V., Tikhonenko S.A., Dubrovskii A.V. // Journal of Analytical Chemistry. 2015. Vol. 70. № 11. P. 1368–1372.

Анализ регуляторной области генов деструкции нафталина и салицилата микроорганизмов рода *Pseudomonas*

Позднякова-Филатова И.Ю.¹, Фролова А.А.¹, Скулкина К.М.², Захарова М.В.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, irafilatova24@gmail.com

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

Метаболические пути деструкции ароматических соединений организованы конвергентно, в результате чего любое ароматическое соединение трансформируется в один из 10 центральных метаболитов, которые далее катаболизируются в интермедиаты ЦТК или используются для синтеза необходимых клетке соединений. Лишь некоторые из этих центральных метаболитов (например, салициловая кислота и катехол) способны выступать в качестве кофакторов транскрипционных регуляторов. Это позволяет клетке тонко регулировать множество важных клеточных процессов посредством узкого круга соединений. Так, деструкция салицилата и нафталина, который в контексте биоремедиации почв рассматривают как высокомолекулярный предшественник салицилата, зависит от транскрипционного регулятора NahR (LysR-семейство транскрипционных факторов), чувствительного к салицилату. Еще в 1986 году при исследовании штамма *Pseudomonas putida* G7 (pNAH7) была обнаружена схема организации генов деструкции нафталина и салицилата, впоследствии названная архетипической. Однако данные, полученные при сиквенировании других катаболических плазмид и геномов штаммов-деструкторов, указывают на то, что при высокой степени гомологии самих генов деструкции в структурной организации такого сходства не наблюдается. Регуляторные гены, называемые *nahR*, могут располагаться как в самом геноме, так и в составе катаболических плазмид. Так как катаболические плазмиды могут не содержать регуляторных генов *nahR-like*, для эффективного процесса деструкции штамм-реципиент не только должен иметь необходимый транскрипционный регулятор, но и обеспечить его взаимодействие с регуляторной областью генов деструкции.

Нами были проанализированы регуляторные области генов *nah1*-оперона (кодирует ферменты конверсии «нафталин-салицилат») и генов *nah2*-оперона (кодирует ферменты конверсии «салицилат-ЦТК») штаммов *P.putida* G7 и *P.putida* AK5. Выбор штаммов был обусловлен тем, что штамм *P.putida* G7 считается архетипичным в исследованиях деструкции нафталина, а гены деструкции, которые содержатся в *P.putida* AK5 на 99% гомологичны генам деструкции нафталина штамма *P.putida* NCIB 9816-4 (pDTG1) и штамма, штамма *P.putida* ND6 (pND6-1). Большинство охарактеризованных к настоящему моменту генов деструкции нафталина (и салицилата) высокогомологичны указанным выше штаммам. При выравнивании анализируемых областей с участком, определенным как сайт связывания NahR, мы обнаружили участок высокой степени гомологии, который имеет в своей структуре вырожденный палиндром. Предполагаемая «идеальная» последовательность палиндрома (TTnnCAnTGnnAA) содержит консенсусный для всех белков LysR-семейства мотив T-N11-A и располагается близко к возможному -35 боксу подконтрольного гена. Подобная схема расположения согласуется со схемой регуляции,

известной для белков LysR-семейства. Jeon в статье 2006 года определил указанный участок, как высокогомологичный для *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, *Ralstonia* sp. strain U2, *P. putida* G7(pNAH7), *P. putida* NCIB 9816-4 (pDTG1). Однако ни в данной статье, ни в дальнейших работах не искали вырожденные палиндромы характерные для транскрипционных регуляторов, функционирующих как гомотетрамеры.

Транскрипционный регулятор SgpR на 100% гомологичен регулятору NagR штамма *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, однако регуляторная область, расположенная между регуляторным и подконтрольным геном (*sgpA* и *nagAa* соответственно), аналогичной идентичности не показывает. Вероятно наличие кросс-регуляции с участием белков NahR и SgpR/NagR, что необходимо исследовать экспериментально.

С помощью программы Virtual footprint в регуляторной области генов деструкции нафталина и салицилата штаммов *P. putida* G7 и *P. putida* AK5 были обнаружены сайты связывания глобальных транскрипционных регуляторов и регуляторов двухкомпонентных систем, участвующих в упаковке ДНК (Fis, H-NS, IHF), катаболической репрессии (Crc), ответе на окислительный стресс (OxyR), метаболизме железа (Fur) и азота (NtrC, NasT), метаболизме некоторых аминокислот (ArgP, Lrp, MetR), чувстве кворума (RhIR). Все перечисленные операторы в основном расположены в области оператора специфических регуляторов и могут конкурировать с ним (и в некоторых случаях с промотором регуляторного гена) за оператор.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05071

Проблема количественной оценки жизнеспособности микроорганизмов: status quo

Пучков Е.О.

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

Понятие жизнеспособности (*англ. viability*) является ключевым в определении микробных клеток как элементов живой материи. Необходимость количественно характеризовать микроорганизмы по "способности быть живыми" существует во всех областях исследовательской и практической микробиологии. Жизнеспособность микробных клеток принято отождествлять со способностью к размножению. Это обусловлено главным образом практическими соображениями: основные макроскопические проявления мира микробов наблюдаются только при формировании больших популяций микробных клеток в результате их размножения.

Размножение микробных клеток можно регистрировать непосредственно с помощью микроскопии (Рис. 1), что используется редко, лишь в специальных исследованиях. Более практичны методы, основанные на макроскопических проявлениях способности микроорганизмов размножаться. Среди них своего рода "золотым стандартом" считается метод учета способности клеток формировать колонии на плотной питательной [1].

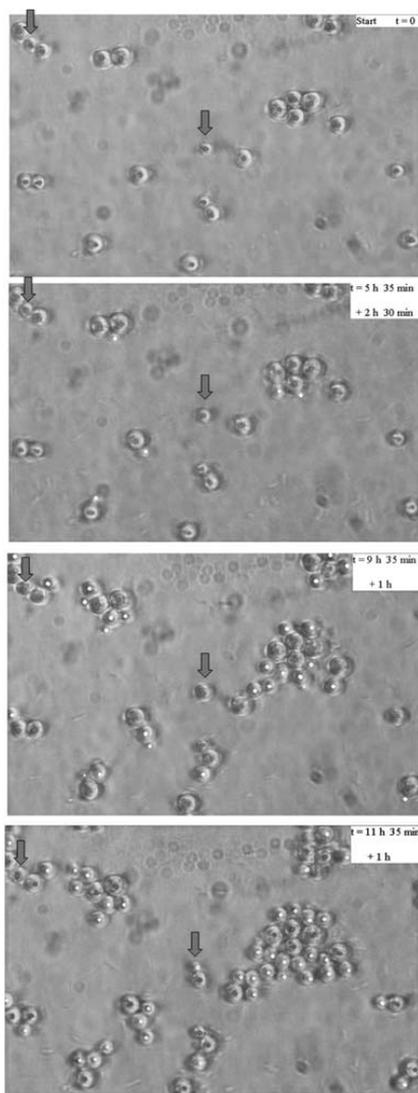


Рис. 1. Размножение клеток *Cryptococcus terreus* на агаризованной среде. Стрелками показаны клетки с существенно заторможенным размножением (англ. "dormant")

Кроме того известно о возможности перехода некоторых микроорганизмов в физиологические состояния, отличающиеся значительным замедлением или временным прекращением деления. В англоязычной литературе эти состояния разные авторы описывают терминами *dormant, moribund, quiescent, resting, starved, sublethally damaged, viable but not culturable* [7, 8] (Рис 1). В этом контексте аналогичными свойствами обладают и так называемые персистентные формы бактерий [9].

Метод отличается трудоемкостью. Для решения этой проблемы имеются специальные устройства - автоматические счетчики колоний, основанные на компьютерном анализе изображений [2]. Одним из таких приборов является созданный нами анализатор колоний микроорганизмов КОМПАНОКОЛ М1 (Рис. 2) [3]. Метод может быть использован только для культур, клетки которых не образуют агрегаты, что всегда необходимо контролировать для адекватной интерпретации результатов [4].

Оценка жизнеспособности клеток по размножению на плотных средах на самом деле отражает их "культивируемость" (англ. *culturability*) при определенных условиях [5]. С помощью таких методов о способности размножаться клеток того или иного препарата/популяции можно судить только *после* регистрации факта размножения, т.е. *по их потомкам* [1]. Количественная оценка жизнеспособности клеток по способности образовывать колоний возможна далеко не для всех видов

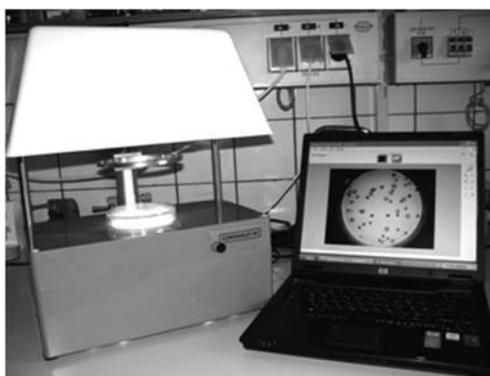


Рис. 2. Компьютерный анализатор колоний КОМПАНОКОЛ М1.

микроорганизмов, что связано с отсутствием сведений об условиях культивирования в лабораторных условиях значительной части микробного мира, выявленной, в частности, методами молекулярной биологии (так называемые "некультивируемые" микроорганизмы) [6].

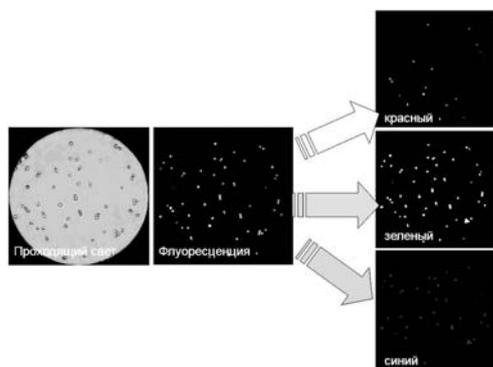


Рис. 3. Компьютерный анализ (RGB расщепление) изображения клеток *Saccharomyces cerevisiae*, полученного с помощью флуоресцентной микроскопии после обработки двумя флуорохромами, избирательно окрашивающими только поврежденные (красный канал) и все клетки (зеленый и синий каналы).

О жизнеспособности клеток микроорганизмов можно судить также по некоторым показателям, от которых зависит их способность к размножению. К их числу относятся функциональная полноценность (в первую очередь барьерная функция) цитоплазматической мембраны, состояние энергетического метаболизма, аппаратов транскрипции и трансляции, интактность ДНК и ряд других [10]. Методы, которые используют для измерения этих показателей жизнеспособности, иногда называют непрямими, т.к. они позволяют лишь прогнозировать способность к размножению при определенных условиях. Так, например, нами был разработан метод прогноза жизнеспособности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после лиофилизации с помощью компьютерного анализа изображений клеток, окрашенных флуоресцентными красителями, дифференцирующими интактные и поврежденные клетки (Рис. 3) [4]. Большие надежды возлагаются на эти методы при оценке жизнеспособности микроорганизмов, в частности, *in situ* [10].

В заключение следует отметить, что проблема количественной оценки жизнеспособности микроорганизмов разных таксономических групп еще далека от решения. Основные исследования по проблеме направлены на поиск методов, основанных на прогнозе жизнеспособности по различным параметрам клеток, в качестве альтернативы методам, основанным на культивировании.

Литература

1. Postgate, J. R. (1969) Viable counts and viability. *Methods Microbiol.* 1, 611-628.
2. Puchkov, E. (2016) Image analysis in microbiology: a review. *Journal of Computer and Communications.* 4, 8-32.
3. Пучков Е.О., Ласуков Ю.И. Компьютерный анализатор колоний микроорганизмов КОМПАНКОЛ-М1. "Вода: химия и экология" №5 с. 29-33, 2008.
4. Puchkov, E.O. (2014) Computer image analysis as a tool for microbial viability assessment: examples of use and prospects. *Journal of Biosciences and Medicines.* 2, No. 3, 1-6.
5. Barer, M.R. and Harwood, C.R. (1999) Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb. Physiol.* 41, 93-137.
6. Solden L., Lloyd K., Wrighton K. (2016) The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol.* 31, 217-226.
7. Lloyd, D. and Hayes, A. J. (1995) Vigour, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 1-7.
8. Davey, H.M. (2011) Life, death, and in between: meanings and methods in microbiology. *Appl. Environm. Microbiol.* 77, 5571-5576.
9. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, No. 5, 320-330.
10. Emerson, J.B. et al. (2017) Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome.* 5, No. 1, 86.

Изучение пути деградации эктоина у *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

Решетников А.С., Мустахимов И.И., Хмеленина В.Н.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино,
mii80@rambler.ru

Рост галофильных и галотолерантных микроорганизмов при повышенных концентрациях NaCl в среде сопровождается накоплением в клетках органических осмопротекторов в концентрациях, уравнивающих внешнее осмотическое давление. Ранее установлено, что облигатный метанотроф *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z при росте на среде с повышенной концентрацией NaCl синтезирует циклическую иминокислоту эктоин в качестве основного осмопротектора (Khmelenina et al., 1999). Поскольку накопление эктоина – процесс, регулируемый внешней соленостью, а молекула осмолита содержит связанные углерод и азот, логично полагать, что у бактерий существует специфический путь ассимиляции данного соединения.

Анализ генома *Mm. alcaliphilum* 20Z выявил четыре ОРС, ориентированные в одном направлении, имеющие гомологию с генами *eutABCDE* у *Sinorizobium meliloti* и *doeABCD* *Halomonas elongata*, роль которых в деградации эктоина доказана (Schwibbert et al., 2011). У *Halomonas elongata* деградация эктоина начинается с гидролиза эктоина ферментом DoeA в α -ацетилдиаминобутират, который затем деацетилируется ферментом DoeB с образованием диаминобутирата, далее фермент DoeD трансаминирует диаминобутират с образованием аспартатполуальдегида, окисляющегося белком DoeC до аспартата.

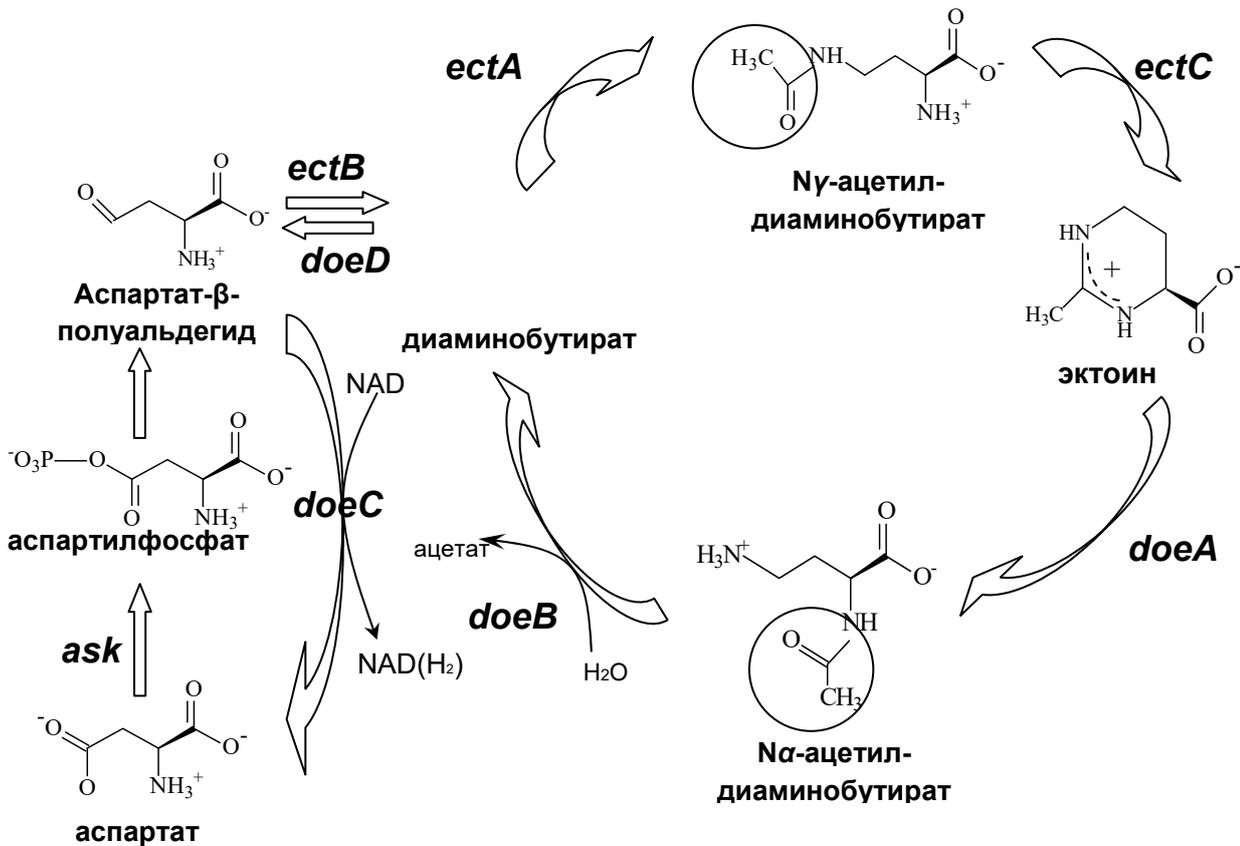


Рис. 1. Предполагаемый путь деградации эктоина у *Mm. alcaliphilum* 20Z.

Для доказательства роли обнаруженных нами ОРС в деградации эктоина у *Mm. alcaliphilum* 20Z были получены штаммы метанотрофа с делецией генов, предположительно кодирующих эктоингидроксилазу (штамм 20ZΔdoeA) и деацетилазу (штамм 20ZΔdoeB), и измерено внутриклеточное содержание эктоина при различных концентрациях NaCl в среде. Показано, что оба мутантных штамма при всех соленостях среды культивирования накапливали больше эктоина (в 1,3-1,4 раза), по сравнению со штаммом дикого типа, однако изменений в скорости их роста и повышения солеустойчивости не выявлено. Кроме того, штамм 20ZΔdoeB в условиях понижения осмолярности среды (*downshock*) с 6 до 2% NaCl накапливал Na-ацетилдиаминобутират, пул которого увеличивался в зависимости от времени инкубации.

Для нарушения регуляции синтеза эктоина на транскрипционном уровне нами были получены плазмиды pMHA200_Pmxa_ectABC, несущая *ectABC* оперон под контролем конститутивного промотора метанолдегидрогеназы (Pmxa). Полученная плаزمиды была введена в клетки дикого типа и мутантного штамма 20ZΔdoeA. В результате в клетках дикого типа в условиях минимальной солености среды (1% NaCl) внутриклеточная концентрация осмопротектора возрастала пятикратно, тогда как в клетках штамма 20ZΔdoeA, несущих вектор pMHA200_Pmxa_ectABC, – только в 2,5 раза.

Таким образом, мы впервые показали наличие у галотолерантных метанотрофных бактерий биохимического пути деградации эктоина. Его функционирование доказано фенотипической характеристикой мутантов *Mm. alcaliphilum* 20Z по ключевым генам данного пути – *doeA* и *doeB*, кодирующим соответственно эктоингидролазу и L-2,4-диаминобутират деацетилазу. Наблюдаемое у штаммов 20ZΔdoeA и 20ZΔdoeB невысокое возрастание уровня внутриклеточного эктоина по сравнению с диким типом объясняется наличием строгой регуляции на уровне биосинтеза эктоина, что подтверждается фактом существенного увеличения уровня осмопротектора в клетках, экспрессирующих гены его биосинтеза под контролем сильного конститутивного промотора в составе плазмиды pMHA200_Pmxa_ectABC. С другой стороны, 2,5 кратное увеличение эктоина в клетках 20ZΔdoeA, трансформированных плазмидой pMHA200_Pmxa_ectABC, относительно клеток дикого типа с той же плазмидой свидетельствует о невысокой метаболической активности пути деградации осмопротектора, что подтверждается накоплением промежуточного продукта распада эктоина – Na-ацетилдиаминобутирата, клетками мутантного штамма 20ZΔdoeB в условиях гипоосмотического шока.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-14-00326

Литература

4. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk. (1999) Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. Arch. Microbiol. **172**, 321-329.
5. Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H. et al. (2011) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Environ. Microbiol. **13**, 1973-1994.

Роль малик-фермента в метаболизме облигатных метанотрофов I и II типов

Розова О.Н., Хмеленина В.Н.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Малик-фермент, катализируя окислительное декарбоксилирование малата до пирувата с восстановлением никотинамидного кофактора, является одним из ферментов, образующих ФЕП-Пируват-Оксалоацетатный узел реакций, связывающих главные пути

углеродного метаболизма и ответственных за распределение углеродного потока между катаболизмом, анаболизмом и энергообеспечением клетки. Методом клонирования и гетерологичной экспрессии генов впервые получены рекомбинантные малик-ферменты из облигатных метанотрофов - *Methylosinus trichosporium* ОВ3b, ассимилирующего углерод метана посредством серинового пути, и *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z с рибулозомонофосфатным циклом C₁-ассимиляции.

Малик-фермент из *Ms. trichosporium* (6 x 81 кДа) катализирует обратимую НАДФ⁺-зависимую реакцию декарбоксилирования малата до пирувата, в присутствии K⁺ (или NH₄⁺) и Mg²⁺ (или Mn²⁺), максимально активен при pH 7,5 и температуре 60°. Ионы Na⁺ ингибировали активность малик-фермента на 40%. Максимальная активность в направлении декарбоксилирования малата составила 36 Е/мг белка, тогда как в реакции карбоксилирования пирувата – 7 Е/мг белка. Были получены следующие значения K_{m каж}: для малата – 2,73 мМ, НАДФ⁺ – 64 мкМ, пирувата – 6,02 мМ и НАДФН₂ – 47 мкМ. Расчет k_{cat}/K_{m каж} показал, что малик-фермент из *Ms. trichosporium* в 10 раз эффективнее в направлении декарбоксилирования малата по сравнению с обратной реакцией. Активность фермента в реакции декарбоксилирования ингибировалась на 32% изоцитратом (1 мМ), на 45% гидроксипируватом (1 мМ) и на 76% ацетил-КоА (0,2 мМ). Сопряженная работа фосфоенолпируваткарбоксилазы, малатдегидрогеназы, пируватфосфаткиназы и малик-фермента приводит к синтезу НАДФН из НАДН, что согласуется с «липогенной функцией» фермента как источника восстановителей, необходимых для биосинтеза жирных кислот.

Анализ аминокислотной последовательности малик-фермент выявил в белке С-концевой фрагмент из 322 аминокислотных остатков, гомологичный фосфоацетилтрансферазам. Однако ни малик-фермент, ни отдельно полученный клонированием и гетерологичной экспрессией в *Escherichia coli* С-концевой фрагмент белка не катализировали перенос ацильной группы с ацетил-КоА на ацетилфосфат. Предполагается, что С-конец химерного белка ответственен за правильную олигомеризацию фермента в виде гексамера.

Малик-фермент из *M. alcaliphilum* - тетрамер (4x65 кДа), катализировал НАД⁺-зависимую необратимую реакцию декарбоксилирования малата до пирувата с удельной активностью 32 Е/мг белка в присутствии Mg²⁺ или Mn²⁺. Ионы K⁺ не активировали фермент, а ионы Na⁺ и NH₄⁺ снижали его активность на 30 и 50%, соответственно. Значение K_{m каж} для малата составило 5,52 мМ, для НАД⁺ – 57 мкМ. Гидроксипируват и ацетил-КоА ингибировали активность малик-фермента на 22% и 14%, соответственно, а изоцитрат не оказывал существенного влияния. Инактивация гена, кодирующего малик-фермент, не влияла на скорость роста мутантного штамма, однако рост на метане сопровождался 20-ти кратным возрастанием концентрации малата в клетках (с 25 до 494 нмоль на мг сырого веса). Ранее для малатдегидрогеназы из *M. alcaliphilum* нами было показано, что фермент имеет почти в 3 раза ниже K_{m каж} для малата, чем для оксалоацетата (0,11 и 0,34 мМ, соответственно), однако K_{m каж} для НАД⁺ составило 450 мкМ, что является определяющим фактором, направляющим активность малатдегидрогеназы на синтез малата и накопления его в мутантном штамме. С учетом высокого значения K_{m каж} для малата, можно полагать, что у *M. alcaliphilum* малик-фермент возвращает «избыточный» малат в основной метаболизм, синтезируя при этом НАДН.

Филогенетически малик-ферменты из *Ms. trichosporium* и *M. alcaliphilum* принадлежат разным классам и имеют всего 16% гомологии. Анализ геномов выявил отсутствие строгой корреляции между типом малик-фермента и таксономической принадлежностью метанотрофов: метанотрофы и большинство метилобактерий из класса Alphaproteobacteria (за исключением *Methyloferula stellata*) и некоторые метанотрофы класса Gammaproteobacteria (*Methylomicrobium album*, *M. agile*, *Methyloglobulus morosus*, и виды родов *Methylovulum* и *Methylosarcina*) имеют НАДФ⁺-зависимый фермент. В то же время, *Methyloterricola oryzae* и *Methylhalobius crimeensis* имеют обе формы малик-

фермента, а у *Methylogaea oryzae* и *Methylocaldum szegediense* O-12 и метанотрофов филума Verrucomicrobia (род *Methylacidiphilum*) малик-фермент отсутствует. В совокупности это указывает на неоднозначную функцию малик-фермента в метаболизме метанотрофов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№18-04-00326)

***Desulfovibrio gilchinskyi* sp.nov.: описание нового вида с применением данных геномного анализа**

Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино; ryzhanova@gmail.com

В многолетнемерзлых отложениях Арктики на глубине нескольких десятков метров были обнаружены высокоминерализованные водные экосистемы (криопэги) морского происхождения возрастом около 12 тыс. лет. Микробный анализ криопэгов показал, что они населены криофильными прокариотами, включая анаэробные бактерии различных физиологических групп [1-5]. Тем не менее, микробное разнообразие криопэгов остается мало изученным. До настоящего времени описана только одна сульфатвосстанавливающая бактерия (СВБ) из криопэга п-ва Варандей - *Desulfovibrio arcticus* [6].

Из криопэга п-ва Ямал (70°18'64"с.ш. 68°00'00"в.д.) с глубины 12.5-20.0 м был выделен новый психроактивный галофильный сульфатредуктор, способный расти при отрицательных температурах. Вода криопэга характеризовалась постоянными отрицательными температурами (-2) - (-4)°С, рН 7.5 и соленостью 77.16 г/л.

Клетки новой бактерии, обозначенной нами как штамм K3S^T, представляли собой подвижные вибрионы, движение которых осуществлялось за счет двух монополярных очехленных жгутиков. Наличие чехла у основания жгутиков является редким и нехарактерным для рода *Desulfovibrio* признаком. Штамм K3S^T рос при температурах от (-2) до 36°С с оптимумом при 26°С, облигатно зависел от содержания ионов Na⁺ в среде и рос при содержании NaCl от 5 до 40 г/л и узком диапазоне рН (6.8-7.4). Штамм K3S^T использовал лактат, формиат, пируват, фумарат, аланин, этанол и молекулярный водород в качестве доноров электронов в присутствии сульфата. Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм K3S^T использовал сульфит, тиосульфат и элементную серу, кроме того был способен восстанавливать цитрат Fe(III) и ЭДТА Fe(III) без видимого роста. Анализ полярных липидов показал, что клетки штамма K3S^T содержат фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, фосфолипиды, кардиолипид и аминоклипид, типичные для представителей рода *Desulfovibrio*. Доминирующими жирными кислотами являлись C_{16:1}ω7, C_{16:0} и C_{18:1}ω7. В клетках был обнаружен десульфовиридин и менахинон МК-6(H₂).

Для штамма K3S^T проведено секвенирование полного генома (U.S. DOE Joint Genome Institute), депонированного в JGI и GenBank под номерами IMG ID 2708742538 и FWZU00000000, соответственно. Размер генома составил 3962538 п.н. В геноме обнаружено 3648 генов, из них число генов кодирующих белки составило 3576, генов кодирующих ферменты 883, 72 РНК, среди которых только одна копия гена 16S рРНК. Содержание Г+Ц пар в ДНК составило 42.3 мол. %.

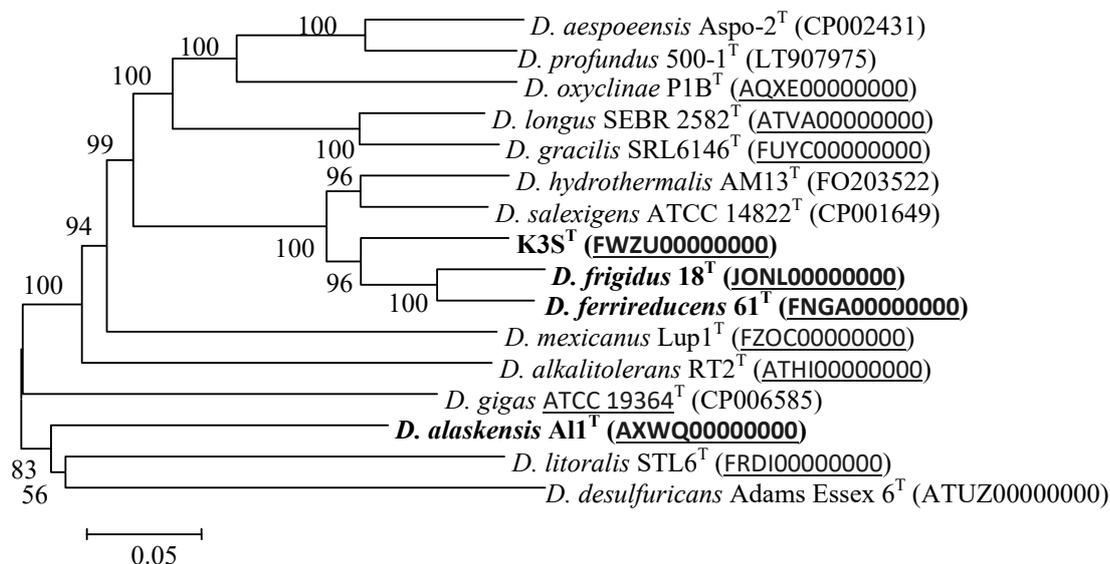


Рис. 1. Филогенетическое древо, показывающее положение штамма K3S^T среди представителей рода *Desulfovibrio*, построенное на основе мультилокусного анализа аминокислотных последовательностей (4333 а.а.) восьми «housekeeping» генов (*gapA-gyrA-gyrB-icdA-mdh-proA-recA-secA*). СББ, выделенные из арктических экосистем показаны жирным шрифтом. Дендрограмма построена с использованием метода “*neighbour-joining*”

Согласно данным мультилокусного анализа аминокислотных последовательностей (4333 а.а.) восьми «housekeeping» генов (*gapA-gyrA-gyrB-icdA-mdh-proA-recA-secA*) выделенный изолят образует отдельную ветвь с представителями уже известных психротолерантных галофильных видов СББ, а его ближайшим родственником с 97.1% сходства по гену 16S рРНК является *D. ferrireducens* DSM 16995^T - бактерия, выделенная из донных отложений Арктического шельфа в районе о. Шпицберген [7]. Среднее значение нуклеотидной идентичности (ANI) штаммов K3S^T и *D. ferrireducens* составило 82.1%, что значительно ниже 95-96%, определенных в качестве границы межвидовых различий.

Ряд фенотипических и генотипических отличий штамма K3S^T и *D. ferrireducens*, в том числе низкое значение ANI, свидетельствуют о том, что штамм K3S^T является новым криофильным видом рода *Desulfovibrio*, для которого предложено название *Desulfovibrio gilichinskyi* sp. nov. (=VKM B-2877^T= DSM 100341^T).

Штамм K3S^T является обитателем экосистемы с высоким уровнем минерализации и постоянными отрицательными температурами и, следовательно, должен использовать осмопротекторы, которые, зачастую, могут выполнять и криопротекторную функцию. С использованием ресурса JGI (<https://jgi.doe.gov/>) проведен анализ геномных данных. У штамма K3S^T были обнаружены гены транспортной системы глицин бетаина ABC-типа (часть высокоаффинной многокомпонентной транспортной системы, участвующей в бактериальной осморегуляции) и малтоолигозил-трегалоза трегалогидролаза (TreZ-белок пути TreYZ биосинтеза трегалозы). Эти же гены найдены как у его ближайших психротолерантных умеренно галофильных родственников (*D. ferrireducens*, *D. frigidus*), так и у других представителей рода *Desulfovibrio*, представленных на рисунке 1: галофильной бактерии *D. salexigens* и психро-/галотолерантной *D. alaskensis*. Кроме того, у ряда галотолерантных (*D. aespoeensis*, *D. longus*) и галофильных бактерий (*D. oxyclinae*, *D. profundus*, *D. gracilis*) был обнаружен еще один ген биосинтеза трегалозы - трегалозо-6-фосфатсинтазы (*tps1*) - фермента, катализирующего первую стадию биосинтеза трегалозы в системе OtsAB. Некоторые галофильные (*D. oxyclinae*, *D. profundus*, *D. gracilis*, *D. frigidus*, *D. ferrireducens*) и галотолерантные (*D. longus*) представители рода *Desulfovibrio*

дополнительно содержали ген бетаин альдегиддегидрогеназы (*betB*), окисляющей альдегид глицин бетаина до глицин бетаина при его синтезе из холина.

Выделение жизнеспособного сульфатредуктора из древней изолированной экосистемы возрастом около 12 000 тыс. лет указывает на то, что СВБ криопэгов являются активным компонентом микробного сообщества. Штамм K3S^T демонстрирует рост даже при отрицательных температурах, используя наиболее распространенные микробные осмо- и криопротекторы - глицин бетаин и трегалозу, и, по-видимому, участвует в терминальной стадии разложения органических веществ в криопэгах вечной мерзлоты. Результаты нового исследования свидетельствуют о значительном вкладе СВБ в глобальный цикл биогенных элементов и биогеохимических процессов холодных экосистем, учитывая, что огромные площади поверхности Земли имеют среднегодовые температуры не выше 5°C.

Литература

1. Gilichinsky D, Rivkina E, Bakermans C, Shcherbakova V, Petrovskaya L *et al.* Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol Ecol* 2005 53: 117-128.
2. Shcherbakova VA, Chuvilskaya NA, Rivkina EM, Pecheritsyna SA, Laurinavichius KS *et al.* Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles* 2005 9: 239-246.
3. Bakermans C, Ayala-del-Río H, Ponder MA, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D *et al.* *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 1285-1291.
4. Щербакова ВА, Чувильская НА, Ривкина ЕМ, Печерицына СА, Суетин СВ *et al.* Новая галотолерантная бактерия из криопэга в вечной мерзлоте: описание *Psychrobacter muriicola* sp. nov. *Микробиология* 2009 78: 98-105.
5. Shcherbakova V, Chuvilskaya N, Rivkina E, Demidov N, Uchaeva V *et al.* *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013 63: 4421-4427.
6. Разумов А.С. Микробный планктон воды / Труды Всесоюз. гидробиологического общества. М.: АН СССР 1962 Т.12: 60-188.
7. Vandieken V, Knoblauch C & Jørgensen BB. *Desulfovibrio frigidus* sp. nov. and *Desulfovibrio ferrireducens* sp. nov., psychrotolerant bacteria isolated from Arctic fjord sediments (Svalbard) with the ability to reduce Fe (III). *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 681-685.

Сравнительный анализ противоопухолевой активности монасникатиновой кислоты, нового метаболита из серии аусталидов и полимера гентиизиновой кислоты

Рысцов Г. К.^{1,2}, Антипова Т.В.¹, Лисов А.В.^{1,3}, Земскова М.Ю.^{1,2}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, mzemskova@ibpm.pushchino.ru

²Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области,
Московский государственный областной университет, Научно-образовательный центр
в городе Пущино, г. Пущино

³ФГБУО Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

Мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* являются многообещающими источниками новых химических соединений, которые обладают разнообразной биологической активностью. Соответственно, много новых молекулярных

структур было зарегистрировано в базах данных за последние десятилетия. Несмотря на это, многие из этих соединений до конца не исследованы с точки зрения их биологической активности, в том числе противораковой. Ранее было установлено, что штамм *A. cavernicola* ВКМ F-906 синтезирует новый пиридиновый алкалоид монасникатиновую кислоту (Antipova et al., 2018). Благодаря молекулярной структуре и наличию в ней азота, это соединение перспективно для дальнейшего изучения биологической активности и получению различных производных. У штамма *A. ustus* ВКМ F-4692 ранее были обнаружен ряд метаболитов, в том числе новое соединение Au-2 из серии аусталидов (Козловский с соавт., 2017). Аусталиды относятся к меротерпеноидам, в настоящее время известно около 30 подобных соединений, для некоторых них показана цитотоксичность для опухолевых клеток. В настоящее время ведется работа по установлению структуры нового метаболита.

Под действием фермента лакказы, выделенной из гриба *Trametes versicolor* нами был синтезирован водорастворимый лигнин-подобный полимер 2,5-дегидробензойной кислоты (гентизиновой кислоты). Это соединение также интересно для изучения биологической активности.

Целью работы являлось исследование потенциальной противоопухолевой активности этих продуктов микробиологического синтеза, с использованием современной технологии xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP, позволяющей анализировать рост и миграцию опухолевых клеток в режиме реального времени

В экспериментах использовались линии клеток рака предстательной железы и мочевого пузыря. Было показано, что все три соединения подавляют, хотя и с разной эффективностью, рост опухолевых клеток. Так, IC₅₀ (полуМаксимальная ингибирующая концентрация) которая подавляет пролиферацию клеток рака простаты, для полимера гентизиновой кислоты составила 22.03 мкг/мл, для монасникатиновой кислоты IC₅₀ = 34.71 мкг/мл (105.5 μМ) и для нового аусталида Au-2 IC₅₀ = 4.92 мкг/мл (8.85 μМ). Измерение при помощи анализатора xCELLigence кинетики миграции опухолевых клеток показало, что полимер гентизиновой кислоты эффективно подавляет миграцию при IC₅₀ 9.05 мкг/мл., для аусталида Au-2 это значение составило 8.89 мкг/мл (13.3 μМ). Монасникатиновая кислота не обладает ингибирующим действием на миграцию опухолевых клеток.

С целью определения возможных клеточных «мишеней» для воздействия исследуемых веществ был использован Human Phospho-kinase Array (R&D systems). Этот анализ позволяет определить уровень активации 43-х клеточных киназ, факторов транскрипции и белков, регулирующих сигнальные пути и экспрессию генов в ответ на изменения в клеточном гомеостазе. Неожиданно, было показано, что синтезированные *in vitro* полимеры гентизиновой кислоты и монасникатиновая кислота, являющаяся метаболитом гриба *A. cavernicola* ВКМ F-906, обладают сходным ингибирующим действием на АКТ-mTOR сигнальный путь, который является одним из основных регуляторов клеточной пролиферации и миграции. Метаболит Au-2, выделенный из гриба *A. ustus* ВКМ F-4692, обладает менее выраженным действием на эти клеточные «мишени». Также показано, что все три вещества ингибируют активности тирозиновой киназы c-Src, продукта онкогена *c-src*, и фокальной адгезионной киназы FAK, которые взаимодействуют друг с другом, для опосредованной регуляции миграции нормальных и раковых клеток человека. Однако, в отличие от полимеров гентизиновой кислоты и аусталида Au-2, в клетках, обработанных монасникатиновой кислотой, наблюдается значительное повышение уровней белка теплового шока HSP60 и продукта протоонкогена *c-jun*. Как показано, оба этих фактора усиливают рост и миграцию клеток и предотвращают клеточную гибель. Таким образом, можно предположить, что подобное комплексное воздействие монасникатиновой кислоты, приводящее к подавлению одних сигнальных путей и активации других, уменьшает или нивелирует

ингибирующее действие этого метаболита на рост и миграцию опухолевых клеток.

Вывод: в результате проведенного комплексного анализа биологической активности трёх исследуемых веществ, два из них – водорастворимые полимеры гентизиновой кислоты, полученные в результате биокаталитического синтеза и метаболит штамма *A. ustus* ВКМ F-4692 аусталид Au-2, могут быть рекомендованы для дальнейших исследований с целью получения потенциальных противоопухолевых препаратов.

Литература

- 1 Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zherebker A.Ya., Tafeenko V.A., Baskunov B.P., Zhelifonova V.P, Ivanushkina N.E., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Kozlovsky A.G. Mendeleev Communication. 2018. V. 28. P. 55-57.
2. Козловский А.Г., Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Озерская С.М. Микробиология. 2017. Т. 86. № 2. С. 164-171.

Особенности экспрессии генов двухдоменных бактериальных лакказ в векторе рQE-30

¹Свиридов А.В., Трубицин И.В.¹, Трубицина Л.И., ^{1,2}Леонтьевский А.А.

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино
lyubov_yurevich@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»

Бактериальные лакказы являются привлекательным объектом исследования благодаря их физико-химическим свойствам, позволяющим использовать данные ферментов в промышленных целях. Новые бактериальные лакказы, в частности двухдоменные, активно изучаются на предмет термостабильности и галотолерантности, а также способности окислять фенольные и нефенольные субстраты при нейтральных и щелочных значениях pH. Целью данной работы является исследование влияния наличия сигнального пептида (СП) на экспрессию лакказ, а также на активность полученных рекомбинантных ферментов.

Объекты исследования – шесть бактериальных двухдоменных лакказ из штаммов стрептомицетов: *Streptomyces puniceus* ВКМ Ас-579, *S. clavuligerus* ВКМ Ас-602, *S. viridochromogenes* ВКМ Ас-629, *S. anulatus* ВКМ Ас-728, *S. griseoflavus* ВКМ Ас-993 и *S. lividans* ВКМ Ас-1709. Для определения последовательности СП гены двухдоменных лакказ анализировали в онлайн-программах: Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) и Prosite (<https://prosite.expasy.org/>). Величины СП, спрогнозированные в указанных программах, представлены в таблице 1.

Табл. 1.

Величина сигнального пептида у бактериальных лакказ

Лакказа из штамма ВКМ:	Онлайн-ресурс		
	Phobius	Prosite	SignalP
Ас-579	1-28	1-35	1-34
Ас-602	1-39	1-31	1-30
Ас-629	1-32	1-32	1-32
Ас-728	1-28	1-35	1-35
Ас-993	1-39	1-39	1-30
Ас-1709	1-30	1-33	1-30

Лакказы были клонированы в вектор pQE-30 с последовательностью и без последовательности СП, кроме ферментов из штаммов Ас-602 и Ас-728, которые были клонированы только без последовательности СП. Лакказа из штамма Ас-602 была клонирована без последовательности СП в трёх вариантах; лакказа из штамма Ас-993 была клонирована без последовательности сигнального пептида в двух вариантах. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Табл. 2.

Данные по экспрессии лакказ с последовательностью СП, а также без него

Номер лакказы в NCBI	Экспрессия с СП	Экспрессия без СП
WP_030190946.1 (из Ас-579)	отсутствие продукции	-35 – активный фермент
AFR45923.1 (из Ас-629)	активный фермент	-32 – активный фермент
WP_057666916.1 (из Ас-728)	н/о	-35 – активный фермент
EFD65350.1 (из Ас-1709)	активный фермент	-30 – активный фермент
ALC76137.1 (из Ас-993)	активный фермент	-30 – отсутствие продукции; -39 – активный фермент
WP_003958642.1 (из Ас-602)	н/о	-30 – фермент не активен; -31 – активный фермент -39 – активный фермент

н/о – не определяли

Установлено, что наличие СП в клонированной последовательности может влиять на продукцию лакказы, как в случае экспрессии лакказы из штамма Ас-579. Кроме того, неверно спрогнозированная последовательность СП может привести к отсутствию продукции фермента, или отсутствию активности у рекомбинантного фермента, как в случае экспрессии лакказ из штаммов Ас-602 и Ас-993.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00566.

Систематика рода *Clavibacter*

**Стародумова И.П.^{1*}, Присяжная Н.В.¹, Тарлачков С.В.^{1,2}, Дорофеева Л.В.¹,
Василенко О.В.¹, Евтушенко Л.И.¹**

¹Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

²Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, iri-starodumova@yandex.ru

Актинобактерии рода *Clavibacter* Davis *et al.* 1984 (семейство *Microbacteriaceae*, порядок *Micrococcales*) – аэробные, грамположительные, неспорообразующие, неправильные палочки. Содержат пептидогликан Б₂γ-типа и преобладающий менахинон МХ-9 в дыхательной цепи.

Первые представители *Clavibacter* были описаны в 1900-х годах прошлого столетия под разными родовыми названиями. Долгое время род включал только один вид *S. michiganensis* с несколькими подвидами. В 2018 году ряд подвигов был переописан в качестве видов на основе геномных данных (Li *et al.*, 2018), и в настоящее время в состав рода входят 6 видов и 4 подвида, имеющие высокий уровень сходства генов 16S рРНК (99.45–100%).

Виды и подвиды *Clavibacter*, за исключением *C. michiganensis* subsp. *californiensis* и *C. michiganensis* subsp. *chilensis*, известны как возбудители сосудистых заболеваний сельскохозяйственных растений (семейства Solanaceae, Poaceae и Fabaceae). Они вызывают бактериальный рак томатов и перца (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. capsici*), кольцевую гниль клубней картофеля (*C. sepedonicus*), мозаичную болезнь пшеницы (*C. tessellarius*), увядание и карликовость люцерны (*C. insidiosus*), бактериальную гниль кукурузы (*C. nebraskensis*), пожелтение листьев фасоли (*C. michiganensis* subsp. *phaseoli*). Виды *C. insidiosus*, *C. sepedonicus* и подвид *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* являются карантинными объектами во многих странах мира (Davis *et al.*, 1984; González and Trapiello, 2014; Li *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2016; Vidaver, 1982).

С накоплением новых данных о распространении *Clavibacter* и выявлением новых бактерий этого рода, ассоциированных со здоровыми растениями, стало очевидно, что существующая система классификации практически не отражает разнообразие сапротрофных представителей *Clavibacter*. Развитие классификации и методов идентификации бактерий этого рода актуально как для ряда областей фундаментальной науки, так и решения практических задач фитопатологии, агробиотехнологии, фитосанитарного контроля.

Нами проведено таксономическое изучение 35 штаммов рода *Clavibacter*, сохраняемых во Всероссийской коллекции микроорганизмов. В их числе штаммы, выделенные из надземной части дикорастущих пустынных растений без видимых признаков заболеваний, таких как *Ammodendron* sp. (песчаная акация) *Bromus* sp. (костер), *Calligonum* sp. (джузгун), *Ephedra* sp. (хвойник), *Gagea* sp. (гусиный лук) и *Salsola* sp. (солянка) (все из пустыни Кызыл-Кум, Узбекистан), *Carex* sp. (осока) и *Festuca* sp. (овсяница) (Государственный природный заповедник «Белогорье», Белгородская обл.), а также из семян солонечника (*Galatella punctata*) (Приокско-Террасный государственный природный биосферный заповедник, Московская обл.). В состав рабочей коллекции входили также изоляты из галлов, индуцированных нематодами подсемейства Anguinae на *Agrostis* sp. (полевица) (остров Сахалин) и *Elymus repens* (пырей) (Московская обл.). Все исследуемые культуры были отнесены к *Clavibacter* на основании высокого сходства с типовыми штаммами видов этого рода по генам 16S рРНК (более 99%).

Результаты анализа МАЛДИ масс-спектров штаммов и сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *gyrB* у представителей выявленных МАЛДИ-кластеров показали принадлежность большинства изученных культур, включая изоляты из нематодных галлов (ВКМ Ас-1790 и ВКМ Ас-2542), к известным видам и подвидам рода *Clavibacter*. Штаммы из пустынных растений (ВКМ Ас-1365, ВКМ Ас-1366, ВКМ Ас-1367, ВКМ Ас-1369, ВКМ Ас-1370, ВКМ Ас-1371, ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374), а также изоляты из овсяницы, осоки и солонечника (ВКМ Ас-1797, ВКМ Ас-2555 и ВКМ Ас-2060), обособляются от кластеров описанных видов и подвидов *Clavibacter* и, скорее всего, относятся к новым (непатогенным) видам и подвидам этого рода.

В рамках данной работы нами были секвенированы и аннотированы геномы штаммов ВКМ Ас-1371 из солянки и ВКМ Ас-1372 из песчаной акации, а также геном типового штамма *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* ВКМ Ас-2641^T. Значения средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity, ANI) и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) геномов двух «пустынных» штаммов между собой (ANI=89.6%, dDDH=41.9%) и по отношению к типовым штаммам видов *Clavibacter* (ANI=89.4–90.4%, dDDH=41.1–43.5%; ANI=87.9–88.6%, dDDH=36–41.9%) ниже общепринятых показателей границ видов (ANI=95–96%, dDDH=70%). «Пустынные» штаммы образуют не свойственный клавибактерам розово-оранжевый пигмент и отличаются друг от друга и от известных видов/подвидов рода на уровне фенотипа: по

полисахаридам клеточной стенки, МАЛДИ масс-спектрам и ряду физиолого-биохимических признаков (Стародумова *с соавт.*, 2015; Тульская *с соавт.*, 2017). Эти данные позволяют описать штаммы ВКМ Ас-1371 и ВКМ Ас-1372, выделенные из пустынных растений, в качестве двух новых видов, *Clavibacter salsolus* sp. nov. и *Clavibacter desertorus* sp. nov.

Мы также предлагаем повысить ранг *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* до уровня вида – на основе величин ANI (90.2–93.2%) и dDDH (42.2–52.8%), определенных между геномом подвида *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и геномами типовых штаммов видов *Clavibacter*, и с учетом значимых фенотипических отличий этого подвида от известных видов этого рода (González and Trapiello, 2014).

Таким образом, результаты сравнительного изучения новых культур и типовых штаммов известных видов и подвигов рода *Clavibacter* показали, что коллекция исследуемых штаммов включает не менее 4-х новых (непатогенных) видов рода *Clavibacter*, обнаруженных в различных пустынных растениях, и что подвид *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* должен иметь статус вида. Впервые показано, что представители *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (ВКМ Ас-1790) и *C. michiganensis* subsp. *californiensis* (ВКМ Ас-2542) присутствуют в нематодных галлах на злаковых растениях.

В ходе исследования создана референтная база данных МАЛДИ масс-спектров штаммов рода *Clavibacter*, которая позволяет идентифицировать штаммы известных видов этого рода и обнаружить потенциальных представителей новых видов. Выявлены компоненты спектров (3356, 4775, 5080, 6716, 9550 *m/z*) – новые хемотаксономические маркеры рода *Clavibacter*.

Литература

1. Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Арискина К.И., Дорофеева Л.В., Автух А.Н. Видовое разнообразие актинобактерий из экосистем с дефицитом влаги. *Российский иммунол. Журнал*. 2015. 9,18(2,1):611–613.
2. Тульская Е.М., Ким Д., Стрешинская Г.М., Шашков А.С., Дмитренко А.С., Сенченкова С.Н., Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ВКМ Ас-1403^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. Сб. тезисов 1-го Российского Микробиологического Конгресса. Пушино. 2017. 87.
3. Davis M.I., Gillaspie A.G., Vidaver A.K., Harris R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1984. 34:107–117.
4. González A.J., Trapiello E. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. 64(5):1752–1755.
5. Li X., Tambong J., Yuan K.X., Chen W., Xu H., Lévesque C.A., De Boer S.H. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. 68(1):234–240.
6. Oh E.J., Bae C., Lee H.B., Hwang I.S., Lee H.I., Yea M.C., Yim K.O., Lee S., Heu S., Cha J.S., Oh C.S. *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. 66(10):4065–4070.
7. Vidaver A.K. The plant pathogenic *Corynebacteria*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1982. 36:495–517.

Исследование влияние цинка на биосинтез липидов *Torulaspora globosa*

Степанова Н.Н., Миронов А.А., Аллаяров Р.К., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино,
asolfr@rambler.ru

Липиды представляют собой важную группу практически ценных продуктов, которые могут быть получены микробиологическим синтезом. Ценность липидов определяется их жирно-кислотным составом. В последние годы растет интерес к липидам с высокой долей пальмитолеиновой кислоты (ПОК) (цис-9-гексадеценовая кислота; $C_{16}H_{30}O_2$). ПОК, благодаря своей уникальной физиологической активности, широко используется для профилактики и лечения социально-значимых заболеваний, таких как нарушение сердечно-сосудистой деятельности, нарушение обмена веществ, ожирение, диабет, воспалительные процессы различной этиологии, онкогенез, апоптоз бета-клеток и др. [1].

Исследования последних лет свидетельствуют о наличии ПОК в липидах дрожжей *Candida sp.*, *Kluyveromyces polysporus*, *Pichia segobiensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulospira delbrueckii*, *Trichosporon cutaneum* и *Yarrowia lipolytica* [1, 2]. В процессах микробиологического получения липидов в качестве углеродного субстрата, как правило, используются углеводы. Однако для снижения себестоимости процесса существенное значение имеет использование дешевых и возобновляемых источников углерода. Этанол рассматривается наиболее перспективным источником углерода, т.к. он может быть получен из возобновляемого сырья: сахарного тростника, свеклы, кукурузы, лигноцеллюлозы и др. Следует отметить, что получение липидов из этанола ограничено отсутствием базовых знаний об условиях ферментации, способствующих направленному синтезу этого продукта. Анализ литературных данных показывает исключительную роль цинка в регуляции метаболизма дрожжей, культивируемых в средах с этанолом [3].

Целью настоящей работы было изучение влияния различных концентраций цинка на показатели роста и синтез липидов дрожжами *Torulaspora globosa* ВКПМ Y-953 в режиме хемостата (со скоростью протока среды $0,05 \text{ ч}^{-1}$).

В ходе выполнения исследований установлено, что в условиях лимитирования роста *T. globosa* этанолом различные концентрации цинка (2,8; 0,28 и 0,1 мг/л) не изменяли выход клеток по массе ($Y_{x/s}$) (55,5–56,7%). Однако, в условиях лимитирования роста клеток цинком ($Zn=0,001$ мг/л) величина $Y_{x/s}$ понижалась в 2,7 раза (до 20,9%). Обнаружена корреляция между содержанием белка, липидов и содержанием макроэлементов в биомассе *T. globosa*. При повышении концентрации цинка с 0,001 до 2,8 мг/л происходило увеличение доли липидов с 9,2% до 27,8 % (на 67%), которое коррелировало с увеличением доли углерода с 51,04% до 42,52 % (на 16,7%) и водорода с 8,01% до 6,94 % (на 13,4%). В то же время при повышении цинка с 0,001 до 2,8 мг/л происходило снижение содержания белка в биомассе с 37,96% до 23,03 % (на 65%), которое коррелировало со снижением доли азота с 7,6 до 4,52 % (на 68,1%).

Для оценки эффективности липидообразования использовали два параметра - жировой коэффициент ($Y_{L/S}$), характеризующий выход липидов из этанола, и энергетический выход липидов ($\eta_{L/S}$), характеризующий долю химической энергии этанола, перешедшую в липиды. Показано, что при понижении концентрации цинка в среде с 2,8 до 0,1 мг/л в условиях лимитирования роста клеток этанолом жировой коэффициент ($Y_{L/S}$) снижался с 0,172 до 0,112 (на 34,9%), а при лимитировании роста клеток цинком – на 72,1%. Также при понижении концентрации цинка в среде с 2,8 до 0,1 мг/л в условиях лимитирования роста клеток этанолом величина энергетического

выхода ($\eta_{L/S}$) снижалась с 0,233 до 0,152, а при лимитировании роста клеток цинком – до 0,065.

Данные о влиянии цинка на жирно-кислотный состав *T. globosa* ВКПМ У-953 представлены в таблице. При всех исследованных режимах культивирования основными жирными кислотами среди насыщенных являлась пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$), среди ненасыщенных – ПОК ($C_{16:1}$) и олеиновая ($C_{18:1}$). Понижение концентрации цинка в среде с 2,8 до 0,1 мг/л в условиях лимитирования роста клеток этанолом приводило к снижению доли $C_{16:0}$ с 24,6 до 16,5% и повышению доли ПОК с 37,5 до 41,7%. Дальнейшее понижение концентрации цинка до 0,001 мг/л приводило к снижению ПОК до 29,2% и увеличению олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) до 42,2 %. В условиях лимитирования роста клеток *T. globosa* цинком появляется незаменимая линолевая кислота ($C_{18:2}$) (7,3% от липидов).

Известно, что превращение пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) в пальмитолеиновую ($C_{16:1}$) происходит при участии Δ -9 десатуразы. Активность десатуразы была оценена измерением соотношения кислот $C_{16:1}/C_{16}$. Обнаружена зависимость между содержанием ПОК в липидах дрожжей и соотношением $C_{16:1}/C_{16}$ кислот. Можно предположить, что биосинтез ПОК у *T. globosa* происходит за счет десатурации пальмитиновой кислоты.

Табл. Влияние цинка на состав жирных кислот (% от липидов) у *T. Globosa*

Жирная кислота	Zn (мг/л)			
	2,8	0,28	0,1	0,001
C_{14}	2,5	3,3	2,1	0,8
$C_{14:1}$	0,4	1,0	0,6	0,7
C_{15}	следы	следы	следы	следы
C_{16}	24,6	23,8	18,6	16,5
$C_{16:1}$	37,5	40,7	41,7	29,2
C_{18}	2,5	1,2	2,1	3,3
$C_{18:1}$	32,5	30,0	34,9	42,2
$C_{18:2}$	следы	следы	следы	следы
$C_{18:3}$	следы	следы	следы	следы
$C_{16:1}/C_{16}$	1,52	1,71	2,24	1,78

Расчётный показатель содержания ПОК в биомассе *T. globosa* был достаточно высоким и достигал 10,4-10,7% (от а.с.б.) при концентрации цинка в среде 0,28 - 2,8 мг/л, что позволяет рекомендовать данный штамм для получения липидов с высоким содержанием ПОК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00794 мол_а.

Литература

1. Kolouchová I. et al. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid // *Bioresour. Technol.* – 2015. – V. 192. – P. 726-734.
2. Степанова Н.Н., Моргунов И.Г. Липиды дрожжей как новый источник пальмитолеиновой кислоты // *Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи. Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием.* 2017. С. 233-236.
3. Kamzolova S.V. et al. Fermentation conditions and media optimization for isocitric acid production from ethanol by *Yarrowia lipolytica* // *Biomed Res. Int.* – 2018. - doi: 10.1155/2018/2543210.

Конструирование магнитотактных наноконтейнеров из клеток грамположительных кокковидных ультрамикробактерий

Сузина Н.Е.¹, Абашина Т.А.^{1,2}, Мачулин А.В.¹, Поливцева В.Н.¹, Шорохова А.П.¹,
Есикова Т.З.¹, Сорокин В.В.³, Дуда В.И.^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино, suzina_nataliya@rambler.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования,
Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

³ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва

Разработка универсальных наноразмерных носителей различных биологически активных веществ, которые не токсичны для живых макроорганизмов, является перспективным направлением в области биотехнологии и разработки средств адресной доставки лекарственных веществ в современной медицине. С этой целью исследователями различных стран мира разрабатываются способы использования различных наноструктур на основе таких носителей как вирусы, липосомы и сложные искусственные липопротеиновые комплексы, включающие в себя магнитные частицы. Недостатками этих структур является их неустойчивость, сложность технологии получения, трудности транспортировки и адресной доставки лекарственных средств.

Нами предлагается новый принцип получения и использования биогенных наноструктур. Сущность этих принципов состоит в использовании, в качестве средств адресной доставки фармацевтических и других биологически активных веществ, магнитотактных гликопептидных наноконтейнеров, сконструированных на основе клеток грамположительных ультрамелких бактерий (УМБ) и содержащих экспериментально полученные (выращенные в лабораторных условиях) внутриклеточные магниточувствительные наночастицы (1,2).

Для получения магнитотактных биологических наноструктур – бактериальных наноконтейнеров, названных нами наномумиями, отобраны модельные штаммы кокковидных ультрамикробактерий (УМБ). Выбор модельных штаммов УМБ основан на их свойстве стабильно сохранять ультрамелкие размеры клеток сферической формы при всех условиях культивирования. Охарактеризованы 3 бактериальных изолята (штаммы КАЗ, КАЗ-1 и КАЗ-2), которые являются ультрамикробионтами кожных покровов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Все три штамма УМБ принадлежат к роду *Nocardioides* и являются грамположительными, мезофильными, аэробными бактериями. Штаммы характеризуются стабильно ультрамелкими размерами клеток сферической формы, диаметром $\leq 0,4$ мкм и объемами клеток $\sim 0,03$ мкм³.

Подобраны оптимальные условия индукции образования некристаллических магнитосом в клетках модельных штаммов на основе использования оригинального метода (1,2). Проведен электронно-микроскопический контроль и анализ элементного состава (рентгеновский микроанализ) тотальных препаратов клеток из полученной биомассы ультрамикробактерий с целью обнаружения внутрицитоплазматических электронно-плотных включений и детекции в них элемента железа.

Получение магнитотактных наномумий осуществляли в 3 этапа: 1) Культивирование микроорганизмов на богатой триптон-соевой среде 5/5 (ИБФМ) с добавлением минеральной формы железа $\text{Fe(II)SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ в концентрации 0,025%; 2) Отмывка и ресуспендирование бактериальных клеток в разработанной авторами минеральной среде; 3) Инкубация в течение 1-2 недель в поле постоянного магнита при 22-24°C. Формирование магниточувствительных включений контролировали: а) визуально, детектированием почернения суспензии клеток и реакцией (притягивание) к постоянному

магниту; б) электронно-микроскопически - с целью изучения динамики формирования и наличия элементного железа в составе внутриклеточных электронно-плотных включений (Рис.1).

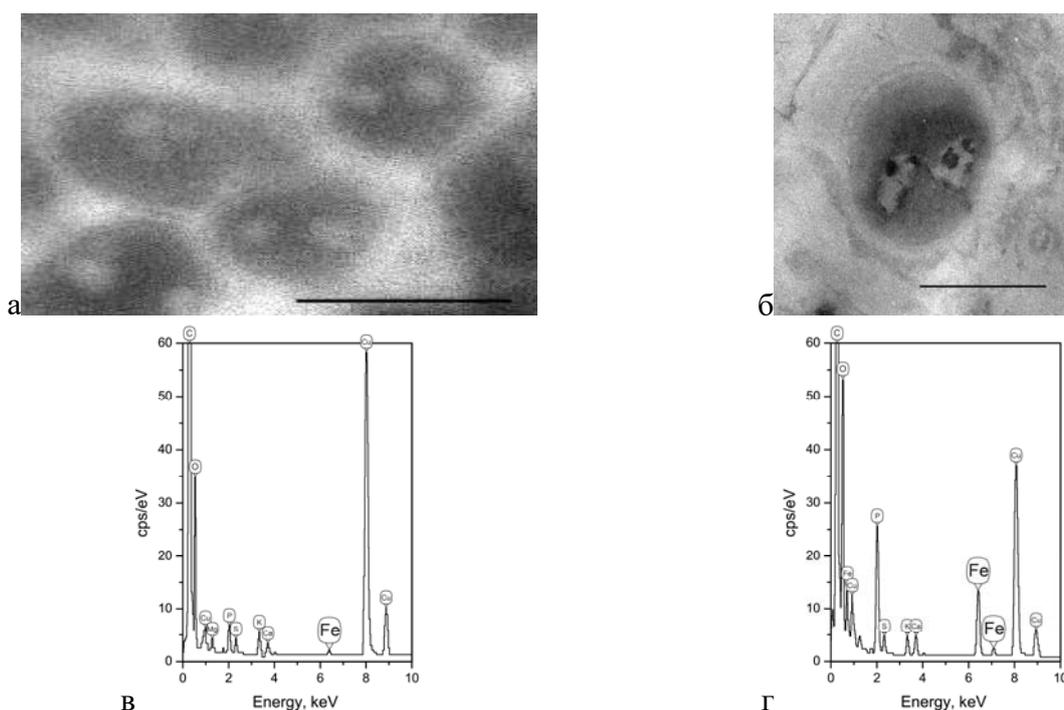


Рис. 1. Неокрашенные ультратонкие срезы клеток штамма КАЗ на богатой среде 5/5 (а) и клетки, инкубированные на среде с минеральной формой железа (б). Рентгеновские спектры соответственно: рисунок (в) для клеток варианта (а); рисунок (г) – для клеток с электронно-плотными включениями варианта (б).

Длина масштабной метки 300 нм

Создаваемые из микромумий клеток УМБ наноконтейнеры, выгодно отличаются по ряду параметров от зарубежных разработок, основанных на использовании органических полимеров (например, разработки Ji-Ho Park et al. В Университете Калифорнии или Sung J.C. et al. в Кембридже (США): Trends Biotechn. 2007. V. 25. p. 563; Wörsdorfer et al., Science, 2011, V. 331, p. 589). Известны работы ряда исследователей по адресной доставке ДНК в целях генной терапии (Felgner, Ringold. Nature. 1989, V. 337, p. 387; Duzgunes N. et al. Curr. Med. Chem., 2003, V.10, p. 1213; Богданенко с соавт., ДАН, 2005, Т. 401, с. 687 и другие).

Электронно-микроскопические исследования и рентгеновский микроанализ выполнены на базе ЦКП «Коллекция UNIQEM» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий», Подпрограмма 3 «Нанобиотехнологии».

Литература

1. Vainshtein M., Kudryashova E., Suzina N., Ariskina E., Sorokin V. "On functions of non-crystal magnetosomes in bacteria", SPIE Proceedings, 1998, V.3441, pp. 280-288.
2. M. Vainshtein, N. Suzina, E. Kudryashova, E. Ariskina. "New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells". Biology of the Cell, 2002, V.94, pp. 29-35.

Двухстадийное получение тестостерона из фитостерина с применением штаммов *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

Текучева Д.Н., Суходольская Г.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутков А.А.,
Донова М.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, tekuchevadn@gmail.com

Андрост-4-ен-17-ол-3-он (тестостерон, Тс) и андроста-1,4-диен-17-ол-3-он (1(2)-дегидротестостерон, болденон, дТс) – андрогенные стероидные гормоны, используемые в медицине и ветеринарии, а также важные предшественники некоторых фармацевтических препаратов. В настоящее время их получают химическим или энзиматическим способом из андростендиона (АД) (Perezetal., 2006). Ранее нами была показана принципиальная возможность одностадийного получения тестостерона из фитостерина с применением актинобактерий *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д, однако, эффективность метода была невысока вследствие относительно низкой собственной 17 β -гидроксистероиддегидрогеназной (17-ГСД) активности микобактерий (Egorova et al., 2009). Недавние исследования показали наличие высокой 17-ГСД активности в отношении 3-кетостероидов у штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д (Sukhodolskaya et al., 2017).

В настоящей работе исследовали возможность двухстадийного микробиологического получения тестостерона и болденона из фитостерина с применением штаммов актинобактерий *M.neoaurum* ВКМ Ас-1815Д, осуществляющих окислительную деградацию фитостерина до АД и АДД (Патент RU N 20779258, 1997), а также *N.simplex* ВКМ Ас-2033Д.

В предварительных экспериментах *in vitro* было подтверждено, что *N.simplex* имеет 17-ГСД активность. Она проявляется в дебрисной фракции и выражается в восстановлении АД до Тс в присутствии NAD(H) и окислении Тс до АД в присутствии NAD.

Фитостерин трансформировали в АД и АДД с применением *M.neoaurum* как описано ранее (Патенты RU N 2039824, 1995; RU N 20779258, 1997). 17 β -Восстановление АД и АДД осуществляли растущей культурой или отмытыми клетками *N. simplex*. Культивирование штамма осуществляли на среде, описанной ранее (Sukhodolskayaetal., 2017), но без индукции ацетатом кортизона. Стероиды (АД, АДД) вносили в виде раствора в 4 % ДМСО до концентрации 2г/л. В момент инокулирования добавляли 15 г/л глюкозы, а также 10 г/л глицерина. Трансформацию проводили в микроаэрофильных условиях (в колбах объемом 100 мл, заполненных наполовину, при 60-70 об/мин), способствующих НАДН-зависимому восстановлению, при 30 $^{\circ}$ С. При использовании отмытых клеток содержание сухой биомассы составляло 1/4-1/5 от нагрузки субстрат, т.е. 0,4-0,5г/л. Стероиды анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ, как описано ранее (Sukhodolskaya et al., 2017).

Как показано на рис. 1а, АДД почти количественно трансформировался в болденон клетками *N. simplex*: его выход достигал 94 % за 72 часа биоконверсии. Трансформация АД в Тс активно происходила только в первые 8 часов, однако, последующая инкубация сопровождалась обратным окислением Тс в АД (рис.1б).

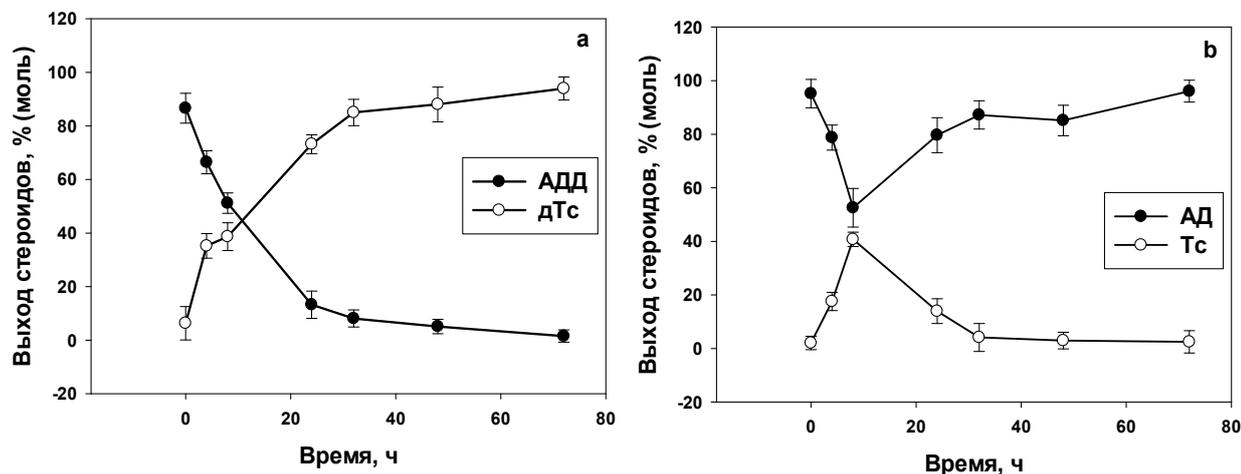


Рис.1. Трансформация 2 г/л АДД (а) и АД (б) *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д

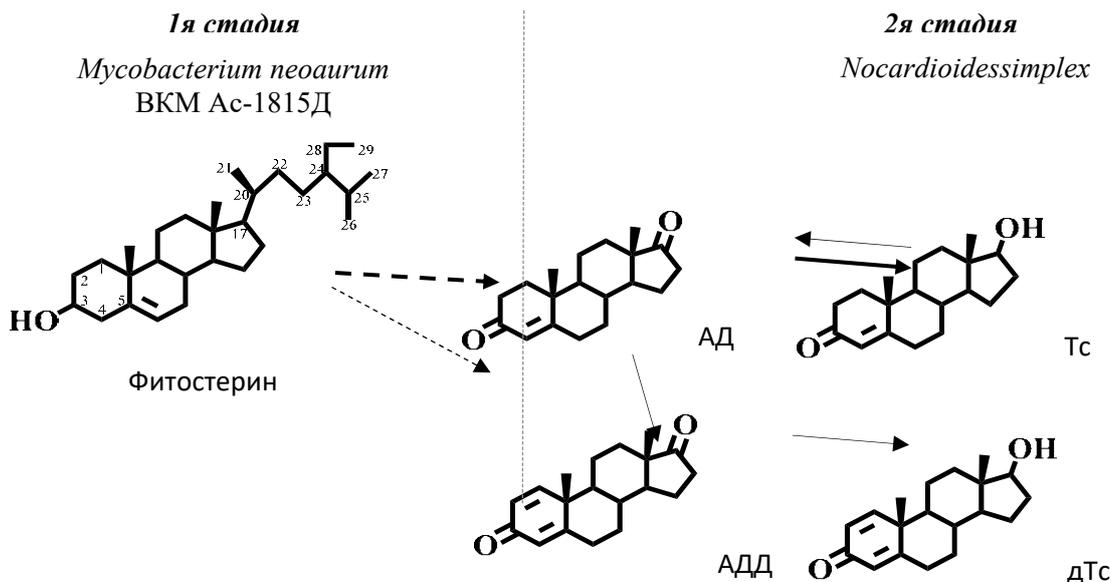
Полученные результаты коррелируют с известными литературными данными о слабой конвертируемости АД ввиду его токсичности для клеток, и различиями в физико-химических свойствах АД и АДД (Fernandez et al., 2003; Egorova et al., 2009).

На следующем этапе работы культуральную жидкость, полученную после трансформации 10 г/л фитостерина *M. neoaurum*, прогревали (50°C, 20 мин), остужали и добавляли осажденные клетки *N. simplex*. Исходное содержание АД в культуральной жидкости составляло 4.36 г/л и АДД – 0,49 г/л. Получение Тс осуществляли в микроаэрофильных условиях (как описано выше). Оптимизировали условия биоконверсии: вносимую биомассу (сухой вес 12-24 г/л), рН (8,0), концентрацию и тип растворителя (4% ДМСО), внесение дополнительного источника углерода и энергии (15-30 г/л глюкозы, применение ингибиторов белкового синтеза (0,4 г/л а,а-дипиридила) для предотвращения нежелательной деструкции стероидного ядра. В найденных оптимальных условиях выход Тс достигал 60% за 24 часа биоконверсии.

Для оценки возможности применения растущей культуры *N. simplex* бесклеточную культуральную жидкость, полученную после трансформации фитостерина *M. neoaurum*, добавляли к культуре *N. simplex*, растущей в течение 40 ч (сухой вес 24-36 г/л), т.е. в стационарной фазе роста. Максимальный выход Тс достигался при добавлении глюкозы (20-30 г/л) и ДМСО (4%) и составлял 55 % за 72 часа трансформации.

Таким образом, впервые изучена возможность двустадийного получения тестостерона и болденона из фитостерина (рис. 2). Результаты могут быть использованы при разработке двухстадийных способов получения этих соединений из фитостерина в одном биореакторе («onepot two-stages microbial synthesis»).

Рис. 2. Схема двухстадийного получения тестостерона и болденона из фитостерина с применением штаммов *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *Nocardioide simplex* ВКМ Ас-2033Д



Благодарности:

Исследование проводилось в рамках государственного задания ФАНО России (№ 0114-2018-303 0004) и ФЦП Минобрнауки России, Соглашение №14.588.21.0008.

Литература

1. Perez C, Falero A, Duc HL, Balcinde Y, Hung BR (2006) J Ind Microbiol Biotechnol 33:719-723. doi: 10.1007/s10295-006-0148-6
2. Egorova O, Nikolayeva V, Sukhodolskaya G, Donova M (2009) J Molec Catal B 57:198-203. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.09.003
3. Sukhodolskaya G, Fokina V, Shutov A, Nikolayeva V, Savinova T, Grishin Y, Kazantsev A, Lukashov N, Donova M (2017) Steroids 118:9-16. doi: 10.1016/j.steroids.2016.11.001
4. Донова М, Довбня Д, Калиниченко А, Аринбасарова А, Морозова А, Вагабова Л, Кощеенко К (1997) Патент RU N 20779258
5. Донова М, Довбня Д, Калиниченко А, Аринбасарова А, Вагабова Л, Морозова З, Кощеенко К (1995) Патент RU N 2039824
6. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS (2003) Enzyme Microb Technol 32:688–705. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00029-2

Нарушение регуляции Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* вызывает перераспределение фракций неорганических полифосфатов

Томашевский А.А., Петров В.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, vpetrov07@gmail.com

Pma1 H⁺-АТФаза плазмалеммы – ключевой фермент энергетического метаболизма дрожжей, который, являясь протонным насосом, создает электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), используемый для обеспечения работы систем активного транспорта веществ в клетку. Функционирование Pma1 H⁺-АТФазы регулируется

метаболизмом глюкозы: при гликолизе образуется АТР и параллельно происходит биогенез фермента, сопровождающийся его множественным фосфорилированием, изменениями конформации и значительному увеличению активности и сродства к субстрату. Это фосфорилирование является регуляторным; обнаружено около 10 фосфосайтов – остатков Ser и Thr, расположенных в различных доменах фермента. Установлено, что глюкозо-зависимая активация H^+ -АТРазы дрожжей связана в первую очередь с фосфорилированием остатков Ser-911 и Thr-912 в С-концевом цитозольном участке молекулы [1].

Кроме АТР, в дрожжевой клетке имеются неорганические полифосфаты (полиР), служащие альтернативным источником энергии и фосфора: их метаболизм является частью энергетического обмена. Логично предположить, что метаболизм полиР может быть напрямую или опосредовано – через метаболизм АТР – связан с функционированием H^+ -АТРазы. **Целью работы** было выяснить, как влияют точечные мутации в Pma1 H^+ -АТРаза, вызывающие нарушение регуляции фермента, на содержание различных фракций полиР у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для работы был выбран родительский штамм NY13 и мутанты с точечными заменами (S911A, S911D, T912D) аминокислотных остатков в регуляторном С-концевом домене. Аминокислотные остатки Ser-911 и Thr-912, фосфорилирующиеся с образованием регуляторной фосфоэфирной связи (серин- и треонинфосфаты), относящейся к О-фосфорилированию, были заменены на Ala или Asp. Замена на Ala приводила к удалению фосфосайта (S911A); в случае замены на Asp возникал потенциальный фосфосайт ацилфосфатного типа (А-фосфорилирование: S911D, T912D). Клетки дрожжей выращивали до середины логарифмической фазы, после чего клетки осаждали, промывали, ресуспендировали и инкубировали 15 мин при 30°C в присутствии или в отсутствие 2% глюкозы. Затем из клеток экстрагировали ортофосфат, суммарные полиР и отдельные их фракции (PP1-5), отличающиеся как длиной цепи, так и локализацией и, соответственно, методом экстракции, или выделяли плазматические мембраны, в которых определяли активность АТРазы *in vitro*.

У штамма NY13 с АТРазой дикого типа наблюдалась глюкозо-зависимая активация фермента, приводящая к увеличению активности на порядок (табл. 1). Мутации приводили к увеличению активности H^+ -АТРазы в 1,6-13,4 раз, при этом наиболее существенно увеличивалась базовая АТРазная активность штаммов (в отсутствие активации глюкозой); особенно это было заметно у штамма S911D, в котором АТРаза была конститутивно активирована; штамм S911A сохранял способность к дальнейшей активации. Штамм T912D занимал промежуточное положение: его базовая активность была увеличена, но в “активированном” состоянии она была меньше, чем у дикого типа; в целом, “активированность” фермента составляла половину от таковой в контроле. Повышенная активность АТРазы штамма S911A, фермент которого сохранял способность активироваться, не влияла на ростовые характеристики, которые были такие же, как у дикого типа. Вместе с этим повышенная активность штаммов S911D и T912D сопровождалась нарушением глюкозо-зависимой активации, что вызывало существенное (в 2-3 раза) снижение скорости роста этих штаммов (табл. 1).

Табл. 1. Влияние точечных мутаций в С-концевом домене Pma1 АТРазы на глюкозо-зависимую активацию фермента и скорость роста дрожжей (%)

	WT		S911A		S911D		T912D	
Глюкоза	-	+	-	+	-	+	-	+
АТРаза	100	948	784	1342	1015	937	158	790
Скорость роста	-	100	-	112	-	35	-	47

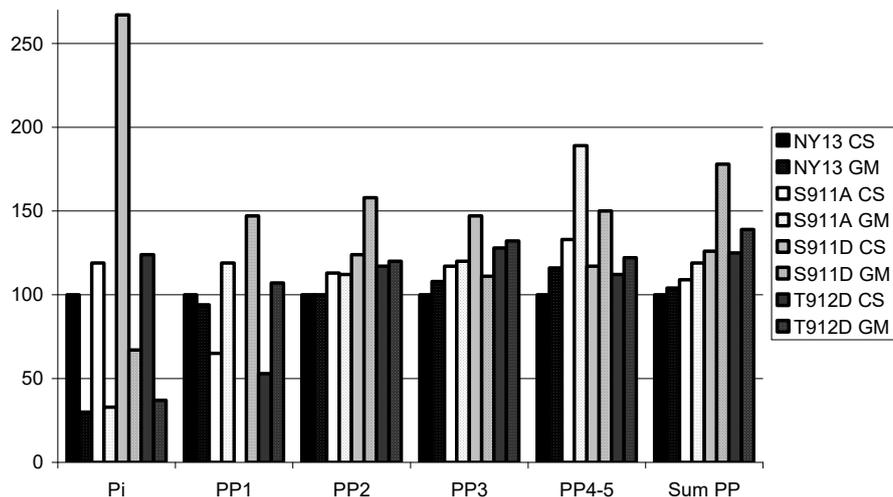


Рис. 1. Влияние точечных мутаций в С-концевом домене Pma1 АТФазы на распределение фракций полиР при глюкозо-зависимой активации фермента (GM) и в ее отсутствие (CS) (%)

По содержанию ортофосфата штаммы S911A и T912D незначительно отличались от дикого типа, как в условиях голодания, так и при ферментации глюкозы (рис. 1), что объяснялось удалением одного из фосфосайтов или изменением его природы. Вместе с тем изменения содержания ортофосфата в штамме S911D были очень значительными, что свидетельствовало о нарушении процесса фосфорилирования фермента. Изменение содержания полиР у штамма S911A было заметно выражено только в случае наиболее короткой и мобильной (PP1) и наиболее длинной и наименее мобильной (PP4-5) фракций. Существенное изменение содержания полиР проявлялись у мутанта S911D: в условиях голодания исчезала фракция PP1, а при ферментации глюкозы ее содержание увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с родительским штаммом; все остальные фракции увеличивались от 20% до 80%, причем количество полиР, в т.ч. и суммарное, наиболее увеличивалось при активации АТФазы. Как и в случае изменения АТФазной активности, в отношении полиР штамм T912D занимал промежуточное положение между S911A и T912D: в 2 раза падало содержание PP1 в условиях голодания, возвращаясь к норме в присутствии глюкозы, на треть увеличивалось содержание PP3 в обоих случаях, а содержание PP2 и PP4-5 было близко дикому типу.

Данные настоящей работы позволяют утвердительно ответить на вопрос о взаимосвязанности функционирования АТФазы и метаболизма полиР и позволяют предположить, что удаление сайтов фосфорилирования в С-концевом домене или изменение типа фосфорилирования вызывают изменения в пуле ортофосфата и перераспределение полиР по фракциям. Дальнейшие исследования необходимы, чтобы выяснить тонкие механизмы фосфорилирования фермента и связи его с метаболизмом полиР.

Литература

1. Lecchi, S., Nelson, C.J., Allen, K.E., Swaney, D.L., Thompson, K.L., Coon, J.J., Sussman, M.R., and Slayman, C.W. (2007) Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 35471-35481.

Метаболический потенциал *Sphaerochaeta associata* на основе анализа генома

Трошина О.Ю., Ошуркова В., Щербакова В.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, oltr676@yandex.ru

Коккоидные бактерии рода *Sphaerochaeta* семейства *Spirochaetaceae* являются составной частью разнообразных анаэробных сообществ микроорганизмов. Родственные сферохетам последовательности генов 16S рНК обнаружены повсеместно в почве, воде, нефтеносных слоях, в пищеварительном тракте животных, в анаэробных реакторах. Таксономически описано четыре вида сферохет *Sphaerochaeta coccoides* SPN1^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T и *S. associata* GLS2^T (1, 2, 3). Три из вышеупомянутых видов образуют тесные пространственные и метаболические ассоциации с другими микроорганизмами. *S. globosa* и *S. pleomorpha* выделены из ассоциации с *Dehalococcoides mccartyi*, а *S. associata* изолирована нами из многолетней бинарной культуры с *Methanosarcina mazei* JL01. Недавно описаны представители новых родов из семейства *Spirochaetaceae*, 'Candidatus *Marispirochaeta associata*' и *Rectinema cohabitans*, которые сосуществуют в многолетних ассоциациях с сульфатредуцирующими бактериями *Desulfovibrio* sp. и *Desulfobacterium* N47, соответственно (4, 5). На основе физиологических и биохимических свойств представителей рода *Sphaerochaeta* предполагается, что основная экологическая функция данной группы заключается в гидролизе углеводов до органических кислот, используемых другими членами сообществ. Однако, биохимические и молекулярные основы крайне тесной трофической ассоциации бактерий *Sphaerochaeta* с микроорганизмами других таксономических групп не известны.

Цель данной работы заключалась в анализе метаболического потенциала *Sphaerochaeta* spp. на основе сравнительного анализа геномных данных для выяснения их роли в образовании и функционировании устойчивых сообществ. Секвенирование и аннотация генома *S. associata* GLS2^T проводилось в Joint Genomic Institute (JGI США). Для анализа использовали также данные геномов *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T и *S. coccoides* SPN1^T.

Распределение числа генов, кодирующих белки, в базе кластеров ортологичных генов (КОГ) показало, что доля генов метаболизма и транспорта углеводов в геномах сферохет значительно выше (около 18%), чем, например, в геномах некоторых представителей спирохет, кластридий, протеобактерий (около 10%). Также в геномах сферохет несколько увеличена доля генов метаболизма и транспорта аминокислот. Бактерии *Sphaerochaeta* содержат большое число генов транспортных систем углеводов, дикарбоновых кислот, олигопептидов и аминокислот, что, по-видимому, объясняет способность этих бактерий длительно сосуществовать в ассоциациях с другими микроорганизмами, используя минимальные концентрации соединений, образуемых в результате деградации некромассы, а также экзометаболиты соседей. В таблице 1 представлены некоторые из предполагаемых транспортных систем углеводов и аминокислот в геномах *Sphaerochaeta* spp. Сферохеты содержат также большое число генов белков метаболизма углеводов: гликозил-гидролазы, гликозил-эстеразы, полисахарид-лиазы. Среди гликозил-гидролаз у всех сферохет наиболее представлены семейства GH2, GH3, GH13, GH20, GH31, GH57, GH77, GH105, а у *S. associata* и *S. globosa* также GH4, GH43, GH88. Гены белков гомологичных хондроитин-дисахарид гидролазе (GH88), гепариназе II/III (PL12), гексозоаминидазе (GH20) присутствуют также в геномах сферохет, что даёт возможность предположить способность этих бактерий использовать компонент полисахаридного каркаса метаносарцин метанохондроитин.

Табл. 1. Число предсказанных генов гомологов транспортных систем сахаров, органических кислот и аминокислот в геномах *Sphaerochaeta* spp. и ряда бактерий

КОГ	Транспортная система	1	2	3	4	5	6
Транспорт углеводов и органических кислот							
КОГ0395	АВС-тип, глицерол-3-фосфат, пермеаза	47	37	44	23	22	2
КОГ0471	Ди- и три-карбоксилаты	3	0	0	0	0	7
КОГ1172	АВС-тип, рибоза, ксилоза, арабиноза, галактозид	13	12	19	16	2	7
КОГ1175	АВС-тип, сахара, пермеаза	37	32	37	16	18	3
КОГ1593	ТРАР-тип, С4-дикарбоксилаты, пермеаза	13	15	11	0	0	2
КОГ2211	Na ⁺ /мелибиоза, симпорт	4	5	6	4	0	4
КОГ2610	H ⁺ /глюконат, симпорт	3	1	2	0	1	6
КОГ4209	АВС-тип, полисахариды	9	5	7	7	4	0
КОГ4211	АВС-тип, глюкоза/галактоза, пермеаза	2	1	2	1	1	1
КОГ4214	АВС-тип, ксилоза, пермеаза	2	2	2	0	2	1
Транспорт аминокислот и пептидов							
КОГ0683	АВС-тип, разветвлённые аминокислоты	2	3	4	4	5	2
КОГ0834	АВС-тип, полярные аминокислоты	6	5	9	4	2	7
КОГ0591	Na ⁺ /пролин, симпорт	2	2	2	0	2	1
КОГ0786	Na ⁺ /глутамат, симпорт	1	1	1	1	0	1
КОГ0765	АВС-тип, полярные аминокислоты	6	5	9	4	2	5
КОГ1135	АВС-тип, D-метионин	1	1	1	1	1	1
КОГ4166	АВС-тип, олигопептиды	1	1	1	2	3	5

1, *S. associata* GLS2^T, 2, *S. globosa* Buddy^T, 3, *S. pleomorpha* Grapes^T, 4, *S. coccoides* SPN1^T, 5, *Spirochaeta cellobiosiphila* DSM17781^T, 6, *Escherichia coli* ATCC 25922^T

Метаносарцина как прототроф по многим аминокислотам и кобаламину может являться источником витаминов и многих аминокислот необходимых *S. associata*. Возможно, что эволюция сферохет шла по направлению редукции части генов синтеза пептидогликана клеточной стенки, подвижности, сигнальных систем хемотаксиса и, напротив, усиления возможности ассимиляции метаболитов и детритной биомассы из окружающей среды.

Секвенирование и аннотация генома *S. associata* выполнены в U.S. Department of Energy Joint Genome Institute, a DOE Office of Science и поддержано грантом No. DE-AC02-05CH11231.

Литература

1. Dröge, S., et al. (2006) *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl Env Microbiol* 72, 392–397.
2. Ritalahti, K.M., et al. (2012) *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 210–216.
3. Troshina, O., et al. (2015) *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 4315–4322.
4. Shivani, Y., et al. (2016) Description of ‘Candidatus *Marispirochaeta associata*’ and reclassification of *Spirochaeta bajacaliforniensis*, *Spirochaeta smaragdinae* and *Spirochaeta sinaica* to a new genus *Sediminispirochaeta* gen. nov. as *Sediminispirochaeta bajacaliforniensis* comb. nov., *Sediminispirochaeta smaragdinae* comb. nov. and *Sediminispirochaeta sinaica* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 5485–5492.

5. Koelschbach, J.S., et al. (2017) *Rectinema cohabitans* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped spirochaete isolated from an anaerobic naphthalene-degrading enrichment culture. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1288-1295.

Разнообразие нефтеокисляющих микроорганизмов из почв Западной Сибири

**Филонов А.Е.¹, Пунтус И.Ф.¹, Ветрова А.А.¹, Соколов С.Л.¹, Сазонова О.И.¹,
Кинжаев Р. Р.², Трофимов С.Я.²**

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пушкино, filonov.andrey@rambler.ru

² Экспертно-аналитический центр по проблемам окружающей среды АНО «Экотерра», Москва

Способность усваивать углеводороды характерна для микроорганизмов разных систематических групп: бактерий родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bacillus*. Эукариотические микроорганизмы (мицелиальные грибы, дрожжи) хотя и обладают высокой углеводородокисляющей активностью, однако в загрязненных экосистемах занимают второстепенное положение. На основании анализа большого количества литературных данных можно сделать вывод, что наиболее распространёнными в загрязнённых нефтью сайтах являются представители родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*. В хронически загрязнённых почвах доминирующей группой являются родококки. Изучение разнообразия микроорганизмов-деструкторов и их численности в популяции необходимо для теоретического обоснования выбора методов ремедиации. Стимуляция аборигенной микрофлоры находится в более выигрышном положении, так как при этом активизируется большое количество различных групп и видов микроорганизмов. Однако существуют ситуации, когда внесение (интродукция) нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязнённую окружающую среду не только оправданно, но и совершенно необходимо.

Целью данной работы являлось исследование разнообразия нефтеокисляющих микроорганизмов из различных сайтов нефтяных месторождений ХМАО (Югра) до и после стимуляции аборигенной микрофлоры.

На первом этапе работы с богатых и селективных агаризованных сред, после подсчета общей численности микроорганизмов и численности нефтедеструкторов, было отобрано 200 колоний, отличающихся между собой по форме, размеру, окраске и консистенции. Из них были получены чистые культуры микроорганизмов, которые были объединены в 30 различных морфотипов. Все штаммы были проверены на способность к деструкции нефти в жидкой минеральной среде с 2% нефти в течение 7 суток. Наиболее эффективные штаммы представляли 11 морфотипов. На втором этапе работы из проб, поступивших через месяц после активации аборигенных микроорганизмов, аналогичным образом выделены чистые культуры микроорганизмов-нефтедеструкторов (30 морфотипов). Все они были проверены на способность к деструкции нефти в жидкой минеральной среде с 2% нефти. Затем отобрали наиболее эффективные деструкторы. Всего было отобрано 11 морфотипов.

Для идентификации микроорганизмов из чистых культур штаммов-деструкторов выделялась геномная ДНК. Амплификацию генов 16S рНК выполняли на амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (“Perkin-Elmer”, США) по стандартным протоколам с использованием Taq ДНК-полимеразы. Для амплификации генов 16S рНК использовали универсальные праймеры 1492R TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT и 27F AGAGTTTGTATC(A/C)TGGCTCAG. Очистку ПЦР-продуктов выполняли по протоколу QIAquick PCR purification Kit Protocol (QIAquick Spin handbook, 2008). Секвенирование

проводили на секвенаторе Applied Biosystems 3130-1 с использованием набора для секвенирования BigDye v.3.1. Хроматограммы сиквенсов формата abi были соединены в контиги при помощи программы ContigExpress.

Табл. 1. Идентификация выделенных микроорганизмов

№	Наименование штамма	Видовая принадлежность	Идентичность, %	Ближайший гомолог
Штаммы, отобранные с участков до внесения удобрений				
1.	6-ДТ	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>
2.	6-2	<i>Chryseobacterium soli</i>	100	<i>Chryseobacterium balustinum</i>
3.	6-3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	99	<i>Rhodococcus sp.</i>
4.	5-1	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	100	<i>Sphingobacterium cladoniae</i>
5.	5-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
6.	4-Н1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
7.	4-3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	100	<i>Acinetobacter sp.</i>
8.	8-ДТ	<i>Paenibacillus tundrae</i>	99	<i>Paenibacillus pabuli</i>
9.	8-2	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	99	<i>Pseudomonas veronii</i>
10.	7-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
11.	3-2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100	<i>Rhodococcus sp.</i>
Штаммы, отобранные после активации аборигенных микроорганизмов				
12.	93-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
13.	93-2	<i>Kocuria rosea</i>	99	<i>Kocuria polaris</i>
14.	91-1	<i>Staphylococcus simulans</i>	99	<i>Staphylococcus sp.</i>
15.	91-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
16.	83-1	<i>Epilithonimonas lactis</i>	99	<i>Epilithonimonas tenax</i>
17.	71-1	<i>Pseudomonas brenneri</i>	99	<i>Pseudomonas yamanorum</i>
18.	39-2	<i>Micrococcus luteus</i>	99	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
19.	37-ДТ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
20.	21-ДТ	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
21.	19-4	<i>Chryseobacterium anthropi</i>	99	<i>Chryseobacterium haifense</i>
22.	1-2	<i>Acinetobacter junii</i>	100	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК и сравнение полученных последовательностей с последовательностями, имеющимися в базе данных,

показали, что среди исследуемых 22 морфотипов присутствуют представители родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Micrococcus*, *Epilithonimonas*, *Staphylococcus*, *Kocuria* и *Paenibacillus* (Табл.1). Микроорганизмов-деструкторов дизельного обнаружено 10^4 - 10^5 кл/г почвы, что составляет около 1% от общей численности микроорганизмов в образцах, а микроорганизмов-нефтедеструкторов меньше 1% (менее $1,0 \times 10^4$ кл/г). Внесение удобрений и известки привело к увеличению общей численности микроорганизмов, а также деструкторов дизельного топлива и нефти в среднем на порядок (результаты несколько варьируют в зависимости от участка). Однако ввиду низкой численности деструкторов нефти (0,1-1% от общей численности микроорганизмов на участках) увеличение численности на порядок не приведет к значительной деструкции нефти. Требуется одновременное внесение специализированных биопрепаратов на основе эффективных микроорганизмов-деструкторов нефти.

Работа выполнена с использованием уникальной научной установки ОТУ ИБФМ РАН(USU279218) и при поддержке гранта РФФИ 16-05-00617 а.

Влияние лигнина на эффективность очистки почвы от углеводородов нефти с использованием биопрепарата «Микробак»

***Филонов А.Е.¹, Пунтус И.Ф.¹, Ахметов Л.И.¹, Ветрова А.А. I, Фунтикова Т.В.¹,
Почуев В.А.², Алехин Р.С.²***

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, filonov.andrey@rambler.ru

² ООО «НПК «Альтернативные технологии», г. Москва

Нефтяное загрязнение приводит к негативным изменениям в почвенных биоценозах, а также к изменениям в химическом составе, структуре и свойствах почв, снижению их плодородия. Высокие концентрации углеводородов нефти токсичны для микроорганизмов как аборигенных, так и инокулированных. Для преодоления этой проблемы эффективно одновременное применение биопрепаратов и сорбентов, которые создают оптимальные условия для жизнедеятельности почвенной микробиоты и ускоряют процесс биоремедиации.

Целью работы было изучение влияния сорбента (лигнина) на эффективность очистки почвы от углеводородов нефти с использованием биопрепарата «МикроБак» в лабораторных условиях.

Для приготовления модельных почвенных систем (МПС) 70 г серой лесной почвы помещали в пластиковые контейнеры «Magenta» с крышкой. Почву загрязняли нефтью до конечной концентрации 10%. В модельные системы вносили биопрепарат «МикроБак» в концентрации 1×10^6 КОЕ/ 1 г почвы и сухой лигнин из расчета 1 г/ 1 г нефти. Влажность почвы доводили с помощью водопроводной воды до 30%. Модельную почвенную систему №1 (почва с нефтью) использовали для контроля за абиотической убылью нефти и биodeградацией за счет аборигенных микроорганизмов. МПС №2 (почва с нефтью и лигнином) – для контроля абиотической убыли, биodeградацией за счет аборигенных микроорганизмов и сорбции нефти на лигнине. МПС №3 (почва с нефтью и биопрепаратом) – для оценки эффективности процесса деградации нефти биопрепаратом. МПС №4 (почва с нефтью, лигнином и биопрепаратом) – для оценки роли сорбента в процессе биodeградации нефти. Продолжительность эксперимента составила 1 месяц. Для определения общей численности микроорганизмов отбирали пробы по 0,5 г почвы, и после серийных десятикратных разведений делали высев на чашки с богатой агаризованной средой 5/5 для подсчета колоний. Остаточную концентрацию

углеводородов измеряли методом ИК-спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-2 (МУК 4.1.1956-05).

Результаты исследования численности микроорганизмов во всех вариантах МПС представлены на Рис. 1. Как видно из полученных данных в течение первых двух недель эксперимента численность микроорганизмов в почве увеличивалась, затем наблюдалось её незначительное снижение. В МПС №3 «биопрепарат» и МПС №4 «биопрепарат и лигнин» наблюдали закономерное увеличение численности вследствие интродукции микроорганизмов в составе биопрепарата. В МПС №2 внесение лигнина незначительно стимулировало увеличение численности популяции аборигенных почвенных микроорганизмов.

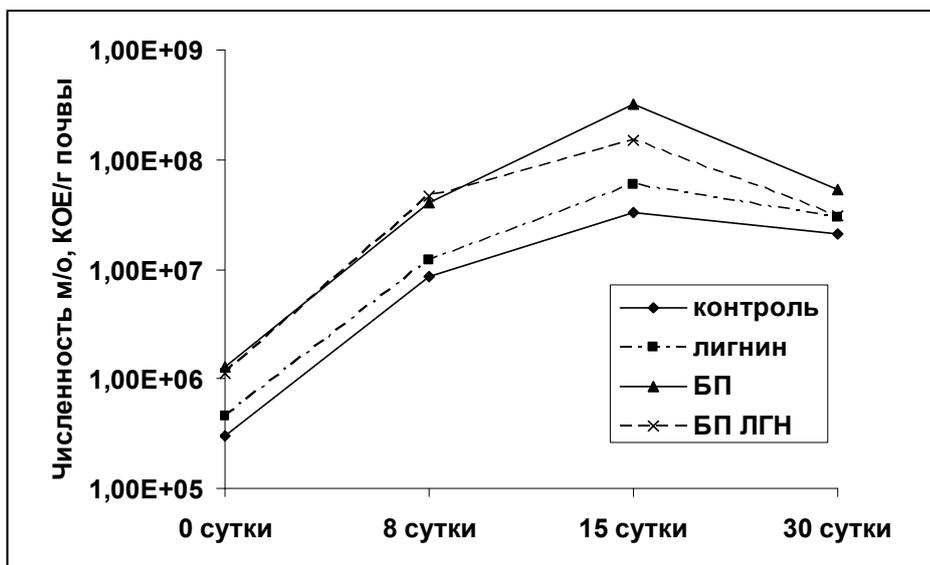


Рис. 1. Динамика численности микроорганизмов в модельных системах с нефтью

Оценка остаточного содержания нефти в МПС показала, что наибольшая убыль (80%) нефти происходила в МПС №4 «биопрепарат и лигнин» (Рис. 2). В МПС №3 «биопрепарат» убыль нефти составила 37%. В МПС №2 «лигнин», которая содержала только лигнин, убыль нефти составила 60%. Поскольку в работе использовалась серая лесная почва, содержащая значительное количество микроорганизмов, использование лигнина в МПС №2 в качестве сорбента привело к ускорению процесса биодegradации нефти за счет аборигенных микроорганизмов.

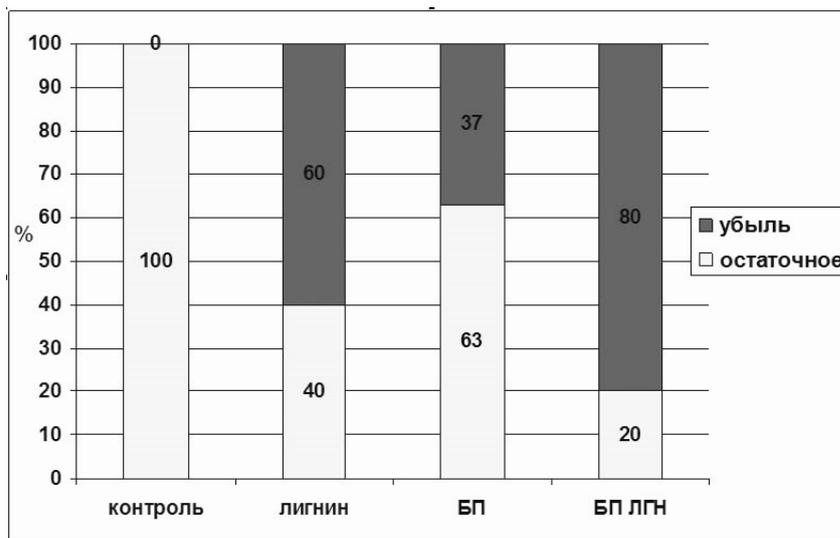


Рис. 2. Остаточное содержание нефти и степень ее убыли в модельных системах за 30 суток

Таким образом, очевидно, что наиболее эффективной представляется технология очистки почвы от нефтяных загрязнений путём интродукции биопрепарата с последующим внесением сухого лигнина, что в 2 раза ускоряет процесс ремедиации почвы от загрязнения.

Работа выполнена с использованием уникальной научной установки ОТУ ИБФМ РАН(USU279218) и при поддержке гранта РФФИ 16-05-00617 а.

Клонирование промотора гена лантан-зависимой метанолдегидрогеназы *hoxF* *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4

Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино,
yulhenbisti@mail.ru

У аэробных метилотрофных бактерий, использующих метанол в качестве источника углерода и энергии, первичное окисление этого C₁-субстрата катализируют метанолдегидрогеназы (МДГ). Ранее считалось, что основной МДГ грам-отрицательных метилотрофных бактерий является хиноновый Са-зависимый фермент – гетеротетрамер, кодируемый генами *txaFI*. Однако в последнее десятилетие был обнаружен и активно исследуется новый тип ферментов – ХохF-МДГ, присутствующий у всех известных на сегодняшний день метилотрофных бактерий, а также у некоторых организмов, для которых способность к росту на метаноле не была продемонстрирована. ХохF-МДГ проявляют наивысшую каталитическую активность в присутствии ионов лантаноидов (лантана, церия, празеодима, неодима, самария) и, тем самым, опровергают длительно существовавшее мнение о биологической инертности редкоземельных элементов. Кроме того, белки ХохF играют важную роль в регуляции экспрессии генов классической MxaFI-МДГ, а также, по-видимому, участвуют в регуляции стресс-ответов бактерий. Тем не менее, молекулярные механизмы функционирования их в качестве регуляторов остаются неизученными.

Деструктор дихлорметана *M. dichloromethanicum* DM4 обладает только одним геном *hoxF* (METDI2492) наряду с генами классической MxaFI-МДГ, что делает его удобным модельным объектом для мониторинга экспрессии с промоторов *txaF* и *hoxF*. Участок ДНК штамма DM4, содержащий промотор гена *hoxF*, обнаруживает 97.5% идентичности с соответствующей областью близкородственного метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1. Ранее было показано, что при клонировании фрагмента промоторной области штамма AM1 длиной 209 п.н. добавление экзогенного лантана не оказывало влияния на экспрессию репортёрного гена (Nakagawa et al., 2012). В тоже время, клонирование более длинной последовательности (1351 п.н., в том числе 733 п.н. выше стартового кодона) обеспечивало прямую зависимость экспрессии от концентрации лантана в диапазоне от 2.5 до 75 нМ (Vu et al., 2016). Наше исследование было посвящено уточнению участка промотора гена *hoxF* штамма DM4, отвечающего за лантан-зависимую экспрессию.

В экспериментах нами был использован вектор pCM160 (Marx, Lidstrom, 2001), в который под контролем промотора гена *txaF* *M. extorquens* AM1 (P_{txa}) был клонирован репортёрный ген зелёного флуоресцирующего белка (GFP) из плазмиды pGreenTIR (Miller, Lindow, 1997). Методом ПЦР был амплифицирован участок предполагаемой промоторной области гена *hoxF* *M. dichloromethanicum* DM4 (P_{hox}), включающей 476 п.н. выше начала кодирующей последовательности. Полученный фрагмент P_{hox} был клонирован в вектор pCM160-*gfp* вместо P_{txa}. Результирующий вектор pCM160-P_{hox}-*gfp* был перенесён в клетки *M. dichloromethanicum* DM4 дикого типа методом двуродительского скрещивания с использованием штамма *E. coli* S17-1. Трансконъюгант wt/pCM160-P_{hox}-*gfp* и исходный

штамм DM4 выращивали на жидких минеральных средах «К» или «ММ» с метанолом (0.5%) до ОП₆₀₀=0.5. Данные среды различаются по содержанию кальция (0 и 152 мкМ, соответственно). Измерение флуоресценции GFP проводили на флуориметре FLUOstar OPTIMA (“BMG Labtech”, Германия), при длинах волн: возбуждения – 485 нм, эмиссии – 510 нм.

Установлено, что в клетках трансконъюганта происходит индукция GFP при добавлении 1 мкМ нитрата лантана (Рис. 1). На среде «ММ» экспрессия репортерного гена увеличивается в 3.4 раза, а на среде «К» – в 7.7 раза (p<0.05). Без добавления лантана в клетках трансконъюганта также наблюдается небольшой уровень экспрессии GFP, который в 1.3-3.1 раза выше, чем в контроле (бесплазмидный штамм DM4), при выращивании на средах «К» и «ММ», соответственно. Это может быть связано как с наличием La³⁺ в компонентах среды, так и с возможностью конститутивной экспрессии с промотора P_{хоx} на относительно невысоком уровне.

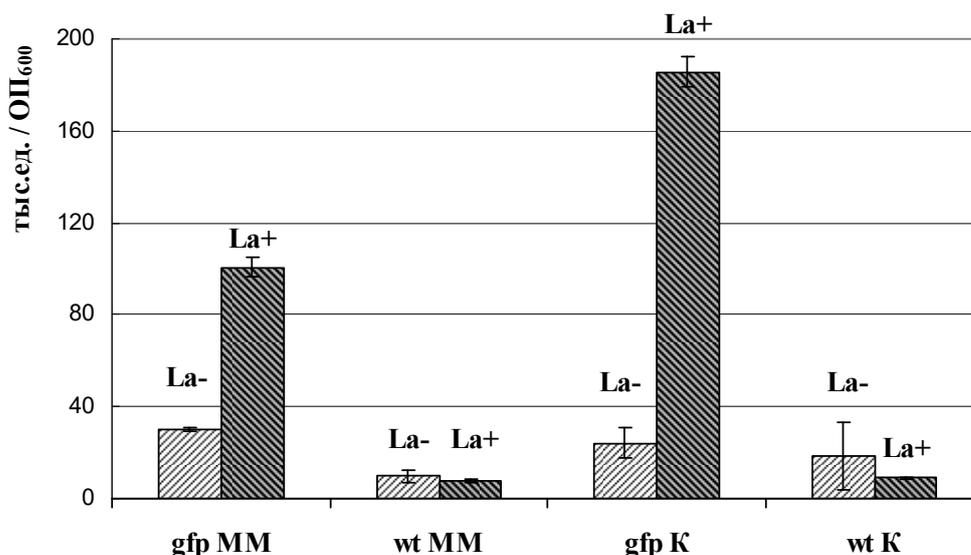


Рис. 1. Флуоресценция клеток (тыс. ед./ОП₆₀₀) трансконъюганта *M. dichloromethanicum* DM4, несущего плазмиду pCM160-P_{хоx}-gfp (gfp), по сравнению с контрольным бесплазмидным штаммом (wt). Клетки выращены на среде «ММ» или «К» с метанолом при добавлении 1 мкМ нитрата лантана (La+) или без внесения лантана (La-).

Таким образом, показано, что участок промоторной области, включающий 476 п.н. выше стартового кодона гена *хоxF* (METDI2492), способен обеспечивать лантан-зависимую экспрессию ХохF-МДГ *M. dichloromethanicum* DM4. Полученный нами вектор pCM160-P_{хоx}-gfp, содержащий ген *gfp* под контролем промотора P_{хоx}, планируется использовать в дальнейших экспериментах по изучению экспрессии гена *хоxF* при росте метиловых бактерий на различных C₁-субстратах и при адаптации бактерий к воздействию стрессоров разной природы.

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

1. Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // *Microbiology*. 2001. V. 147. № 8. P. 2065-2075.
6. Miller W.G., Lindow S.E. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions // *Gene*. 1997. V. 191. № 2. P. 149-153.
4. Nakagawa T., Mitsui R., Tani A., Sasa K., Tashiro S., Iwama T., Hayakawa T., Kawai K. A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 // *PLOS One*. 2012. V. 7. P. e50480.

5. *Vu H.N., Subuyuj G.A., Vijayakumar S., Good N.M., Martinez-Gomez N.C., Skovran E.* Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. P. 1250-1259.

Активация модифицированной про-каспазы-3 свиньи протеазой S273R вируса АЧС в клетках млекопитающих

Холод Н.С., Безлепкина Т.А., Майоров С.Г., Кузницын Р.А., Пересадына А.В., Шляпников М.Г., Грановский И. Э.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, n.kholod@ibpm.pushchino.ru

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная геморрагическая болезнь свиней с летальностью близкой к 100%. Возбудителем африканской чумы свиней является ДНК-содержащий вирус семейства *Asfarviridae*, поражающий в первую очередь лейкоциты и макрофаги свиней, а затем и другие ткани животного. Вирус АЧС кодирует до 175 различных белков, включая те, которые обеспечивают его способность уклоняться от защитных систем организма: подавляют систему врожденного иммунитета, а также внутриклеточные противовирусные механизмы. По этим причинам до сих пор не удается получить эффективные средства профилактики и лечения АЧС. Целью данной работы является исследование возможности вовлечения протеазы S273R вируса АЧС в процесс активации каспазы-3 в клетках млекопитающих и последующую индукцию апоптоза на ранней стадии вирусной инфекции. Эффекторная каспаза-3 является ключевым ферментом в запуске апоптотической гибели клетки, после чего процесс становится необратимым. В клетках эукариот каспаза-3 синтезируется в виде предшественника - прокаспазы, для активации которого необходим ограниченный протеолиз в линкере, соединяющем две субъединицы, а также удаление лидерного N-концевого пептида. Мы предположили, что введение сайта протеазы S273R вируса АЧС в линкер прокаспазы-3 позволит запускать процессинг и активацию каспазы. Известно, что протеаза S273R вируса АЧС играет важную роль в жизненном цикле вируса, поскольку именно она осуществляет процессинг вирусных полибелков. Кроме того протеаза S273R входит в состав вириона и необходима для эффективного прохождения начальных стадий вирусной инфекции.

На первом этапе исследования было проведено введение сайта протеазы S273R вируса АЧС в линкер между большой и малой субъединицами прокаспазы-3, получены очищенные препараты модифицированной прокаспазы-3 и изучен её процессинг и активация вирусной протеазой *in vitro*. В результате проведенного исследования были отобраны варианты модифицированной прокаспазы-3, которые эффективно процессируются протеазой S273R вируса АЧС с образованием активной каспазы-3. В задачи данного этапа исследования входит изучение процессинга и активации отобранных модифицированных прокаспаз протеазой S273R вируса АЧС в культуре клеток млекопитающих. Для решения данной задачи нами были получены генетические конструкции, кодирующие кДНК модифицированной прокаспазы-3 или ген протеазы S273R вируса АЧС под контролем промотора фактора элонгации EF-1 α , для их экспрессии в эукариотических клетках. Данные конструкции кодируют исследуемые белки, слитые с последовательностью так называемого HA-tag – участком гемагглютинаина вируса гриппа, для последующего их обнаружения методом вестерн блота с антителами к HA-tag. Клетки COS-1 были трансфицированы полученными конструкциями прокаспазы-3 и протеазы S273R, как по отдельности, так и вместе для их совместной экспрессии. Анализ активности вирусной протеазы S273R в клеточных

экстрактах показал, что протеаза является неактивной ни в отношении модифицированной прокаспазы-3, ни в отношении разработанного ранее субстрата, содержащего сайт узнавания данной протеазы. Мы предполагаем, что для проявления активности протеазы S273R необходима вирусная инфекция, как это было показано для протеазы родственного вируса оспы. Далее, мы изучили процессинг и активацию модифицированной прокаспазы-3 в клеточных лизатах при добавлении рекомбинантной протеазы S273R, выделенной из *E.coli*. Такой препарат протеазы обладает активностью *in vitro*, как было продемонстрировано нами ранее. В экспериментах с клеточными лизатами, содержащими различные варианты модифицированной прокаспазы-3 мы установили, что протеаза S273R способна расщеплять модифицированную прокаспазу-3 по сайту в междоменном линкере, что приводит к ее активации и появлению в лизатах специфической каспазной активности на синтетическом DEVD-субстрате.

Проведенные нами исследования создают основу для дальнейшего изучения способности протеазы S273R вируса АЧС активировать модифицированную прокаспазу-3 при вирусной инфекции и последующей инициации апоптоза в культуре клеток млекопитающих.

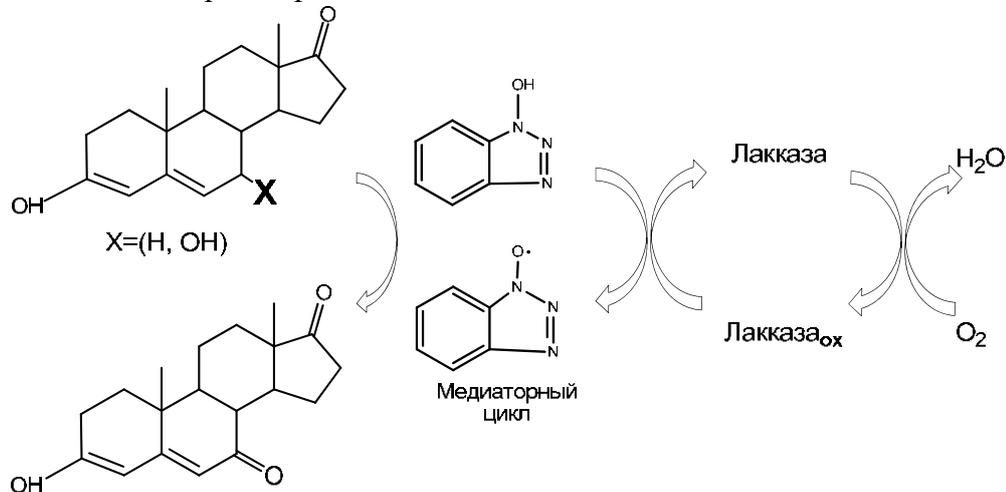
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08010.

Влияние циклодекстринов на региоселективное окисление грибной лакказой 3 β -гидрокси- Δ^5 -андростена и его 7 α - и 7 β - гидроксипроизводных

Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.Пушино,
skhomutov@rambler.ru

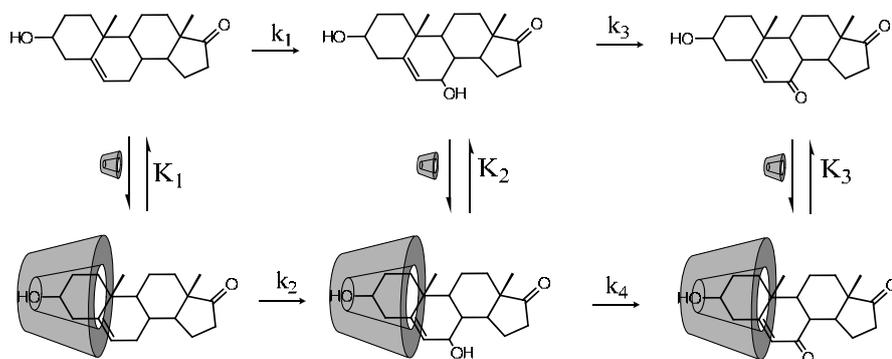
Внедрение биотехнологических методов и замена ими многоступенчатых химических синтезов является современным трендом в развитии экологически чистых стероидных технологий для фармацевтической промышленности. Литературные данные по окислению стероидов с помощью лакказных (ЕС 1.10.3.2, кислород оксидоредуктаза) медиаторных систем (ЛМС) ограничены димеризацией С-С и С-О стероидов с фенольной структурой А-кольца [1]. Недавно мы описали региоспецифическую ЛМС оксифункционализацию нефенольных 3 β -гидрокси- Δ^5 стероидов [2]. В настоящей работе мы изучали ЛМС окисление дегидроандростендиона (ДГЭА) и 7 α - и 7 β - гидроксипроизводных в водных растворах.



Мы исследовали влияние молекулярного капсулирования стероидных субстратов на ЛМС биоконверсию. Известно, что гидрофобность стероидов является препятствием для разработки препаративных ферментативных синтезов. В настоящей работе оценивалась целесообразность использования циклодекстринов (ЦД) в качестве солюбилизирующих агентов в препаративных синтезах 7-кетопроизводных 3β - Δ^5 -стероидов.

Эксперименты с ЛМС окислением ДГЭА проводились в водных растворах pH=5.0 при 40°C грибной лакказой (*Trametes versicolor*) с использованием медиатора 1-гидроксibenзотриазола. Влияние ЦД изучали в гомогенных и гетерогенных водных системах. Параметры ЦД комплексообразования определялись независимым нелинейным спектрометрическим методом [3]. Кинетические исследования проводились с помощью ВЭЖХ-мониторинга ЛМС конверсии. Значения константы устойчивости ЦД-комплекса ДГЭА (K_1) при 40°C составляли 5544 M^{-1} .

Было установлено, что ЛМС окисление ДГЭА (гомогенные условия) приводило к образованию 7-кето-ДНЕА в качестве единственного продукта. Расчет констант скорости окисления ЛМС проводили для свободных (k_1) и ЦД (k_2) форм стероидов. Показано, что влияние ЦД выражается в дезактивации аллильного (С-7) водорода и препятствии его отрыва в условиях ЛМС окисления по радикальному механизму ($k_1 \gg k_2$). В то же время скорость ЛМС окисления ЦД комплексов 7α -ОН-ДГЭА (k_3) и свободных стероидных форм ДГЭА (k_4) в 7-кето-ДГЭА имеют близкие кинетические параметры.



Сделан вывод о целесообразности использования ЦД в качестве солюбилизирующего агента в препаративных ЛМС синтезах 7-кетопроизводных 3β - Δ^5 -стероидов из соответствующих спиртов.

Литература

- [1] Wells A., Teria M., Eve T., *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, 34(2), 304-307.
- [2] Khomutov S.M., Shutov A.A., Chernikh A.M., Myasoedova N.M., Golovleva L.A., Donova M.V. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 2016, 123, 47-52
- [3] Khomutov S. M.; Sidorov I. A.; Dovbnya D. V.; Donova M. V., *J. Pharm. Pharmacol*, 2002, 54 (5), 617-622.

Настоящая работа поддержана Федеральным агентством научных организаций (№ 0114-2018-0004) и Российским научным фондом (№ 18-14-00361).

Штамм *Serratia sp. ASf1*, устойчивый к высоким концентрациям железа (III)

Хохлова Г.В., Филатова И.Ю., Лауринавичус К.С., Вайнштейн М.Б.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Бактерии рода *Serratia* являются факультативными анаэробами и встречаются в различных местообитаниях, в том числе в пресных источниках, ризосфере растений, в пещерах и в загрязненных промышленностью почвах. Штамм *Serratia sp.* ASf1 выделен Г.В. Хохловой из пресного ручья, сообщающегося с Белым морем, на территории государственного геологического памятника природы в Терском районе Мурманской области. Этот участок примечателен наличием лимонита и гематита в слагающих породах, что придает слагающим песчаникам характерную красновато-шоколадную окраску. Возраст отложений составляет около 1 миллиарда лет (Жиров и др., 2006).

Выделение и основное культивирование штамма после его выделения в чистую культуру проводили при 25°C на полной среде FSM (Faivre, Schuler, 2008), содержащей цитрат Fe (III) от 100 мкМ до 5 мМ. Изучение физиологических характеристик показало, что штамм относится к мезофильным микроорганизмам, растет при температуре от +8 до +37°C (оптимум +18°C), при солёности от 0 до 20 г/л NaCl (оптимум 1 г/л) и при pH от 6 до 9. Штамм устойчив к антибиотикам линкомицину, бензилпенициллину, эритромицину и рифампицину. Оптимальное содержание железа (III) для роста составляло 2мМ. Для идентификации штамма тотальную ДНК из клеток выделяли стандартным фенол-хлороформным методом по Мармуру (Marmur, 1961) с предварительным трёхкратным замораживанием и оттаиванием осажённых клеток; далее проводили ПЦР с универсальными бактериальными праймерами; секвенирование 16s рРНК гена проводили в компании «Евроген». Штамм *Serratia sp.* ASf1 имеет сходство 99% с *S. quinivorans*.

Интересно отметить, что, при наличии в агаризованной среде 15г/л растворённого хелата железа (III), в процессе роста бактерий среда становилась более щелочной, это изменение pH сопровождалось потемнением среды с изменением цвета на красно-шоколадный. После подщелачивания среды бактерии начинали использовать агар в качестве источника углерода, о чём свидетельствовало образование лунок в среде вокруг колоний. Наблюдавшееся изменение окраски среды объясняет особенный красновато-шоколадный цвет песчаников из района выделения штамма. В дальнейшем механизм окисления железа с подщелачиванием можно рассматривать также как одну из моделей формирования красных грунтов Марса, в которых, как известно, преобладает железо (III).

Методом масс-спектрометрического анализа пептидов и белков (MALDI) было изучено влияние различных металлов на выделенный штамм. Наибольший интерес представляло изучение влияния тяжелых металлов, так как оно позволяет рассматривать дальнейшее использование штамма с целью извлечения металлов или биоремедиации. Показано, что при добавлении сульфата никеля, хлорида кобальта и сульфата меди в концентрациях 100-300 мкМ бактерии сохраняли активность и жизнеспособность, но в пептидном профиле штамма происходили изменения.

Выделенный нами штамм *Serratia sp.* ASf1 перспективен для заводняемых почв с высокой концентраций железа. Он представляет интерес для дальнейших исследований в области взаимодействия металлов и микроорганизмов, биоремедиации, а также для модельных процессов астробиологии.

Литература

1. Жиров Д. В., Пожиленко В. И., Белкина О. А., Костина В. А., Королева Н. Е., Константинова Н. А., Урбанавичене И. Н., Давыдов Д. А. Терский район (серия «Памятники природы и достопримечательности Мурманской области»). // Издание 2-ое, исправленное и дополненное // Санкт-Петербург: изд. Ника, 2006. 128 с. Министерство природных ресурсов и экологии Мурманской области.
2. Faivre D., Schuler D. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes. // Chemical Reviews, 2008. Vol. 108 (11). P. 4875–4898.
3. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. // Journal of Molecular Biology. 1961. Vol. 3 (2). P. 208-218.

Ancylobacter lacus sp.nov. – новый вид аэробных метилотрофных бактерий из пресного озера

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, chemodurova.alina@mail.ru

Представители рода *Ancylobacter* являются хемоорганотрофными бактериями, которые встречаются в различных экологических нишах (в водной среде, донных осадках или в почве). В настоящее время валидно описаны восемь видов данного рода: *Ancylobacter aquaticus*, *Ancylobacter rudongensis*, *Ancylobacter polymorphus*, *Ancylobacter vacuolatus*, *Ancylobacter oerskovii*, *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Ancylobacter defluvii*, *Ancylobacter sonchi* и *Ancylobacter pratisalsi*. Из воды пресного озера (г. Пущино, 54°49'13.8"N 37°34'42.5"E) нами на среде с метанолом выделен новый факультативно-метилотрофный штамм F30L.

Цель работы – физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика нового метилотрофного изолята - штамма F30L.

Новый изолят представлен аэробными, грамотрицательными, неспорообразующими, неподвижными грушевидными клетками, которые размножаются бинарным делением (рис.1). Наряду с метанолом изолят использует широкий ряд полиуглеродных соединений в качестве источников углерода и энергии. Растет в диапазоне pH 7,0-7,5 (оптимально pH 7,2) и температуры 20-37 °C (оптимально 30 °C) в присутствии 0,05-1,5 % NaCl (оптимально 1%), оксидазо- и каталазоположителен, уреазоотрицателен. Штамм F30L имеет активности лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, триптофандеаминазы и β-галактозидазы. Продуцирует ацетоин. Не образует H₂S.

Энзимологический анализ показал, что штамм F30L окисляет метанол классической метанолдегидрогеназой и реализует рибулозобисфосфатный путь C₁-метаболизма, о чем свидетельствует активность ключевого фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы. В ассимиляции аммония принимают участие глутаматдегидрогеназа и глутаматный цикл (глутаматсинтаза, глутаматсинтетаза).

При росте исследуемого штамма на R2A агаре (28 °C, 2 суток) в жирнокислотном составе клеток доминируют C_{18:1ω7c} (96.1 %), C_{16:0} (2.4 %) и C_{18:0} (1.1 %). В фосфолипидном составе клеток доминируют фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин и фосфатидилмонометилэтанолламин. Основной убихинон Q-10.

По данным секвенирования гена 16S рРНК штамм F30L проявил наибольшее сходство с представителями рода *Ancylobacter*: 97,8% с *A. dichlormethanicus* DM16^T (ACB98721), *Ancylobacter defluvii* SK15^T (KC243678) и 97,6% с *A. aquaticus* DSM 101^T(M62790) (рис.2).

Однако ДНК-ДНК гибридизация штамма F30L с *A. dichlormethanicus* DM 16^T (VKM B-2484^T) и *A. aquaticus* DSM 101^T (M62790) выявила только 20-22 % их гомологии.

Кроме этого, для определения генотипических различий между исследуемым штаммом и типовыми представителями рода *Ancylobacter* был использован метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ). Результаты RAPD-анализа показали, что штамм F30L имеет профили продуктов амплификации отчетливо отличающиеся от таковых у типовых представителей рода *Ancylobacter* количеством полос и их молекулярным весом, что указывает на отличие нового изолята от типовых культур данного рода.

Проведенный MALDI анализ масс-спектров препаратов бактериальных клеток представителей рода *Ancylobacter* также показал, что штамм F30L четко обособляется от всех остальных видов рода *Ancylobacter*.

Результаты полифазного таксономического анализа дают основание отнести штамм F30L к новому виду рода *Ancylobacter* и предложить для него новое видовое название *Ancylobacter lacus* sp.nov.. Типовой штамм вида F30L (=VKM B-3280^T=DSM 106439).

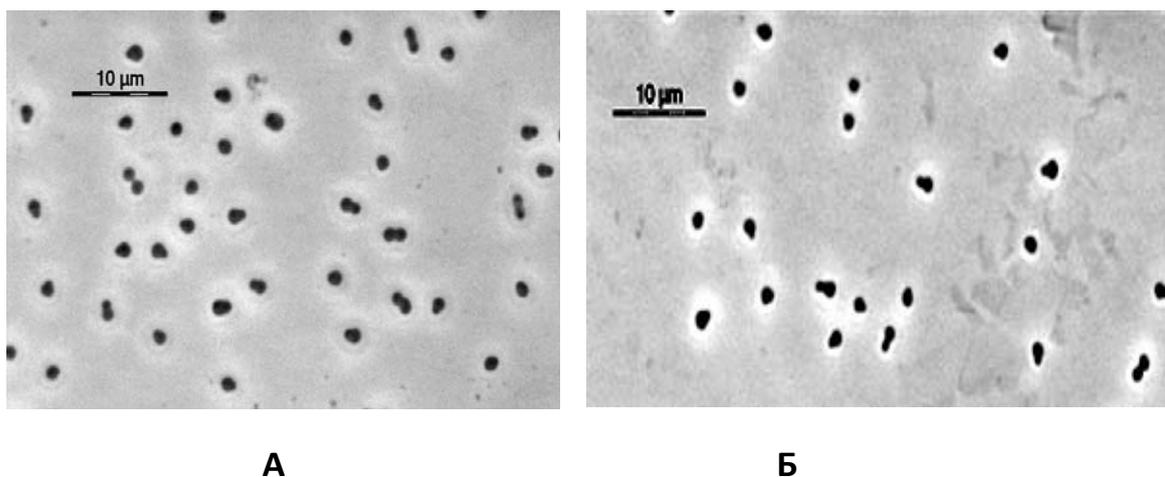


Рис. 1. Морфология клеток штамма F30L, выращенных на агаризованной минеральной среде “К” с метанолом (А) и агаризованной богатой среде 5/5 (Б). Фазовый контраст (длина масштабной метки 10 мкм).

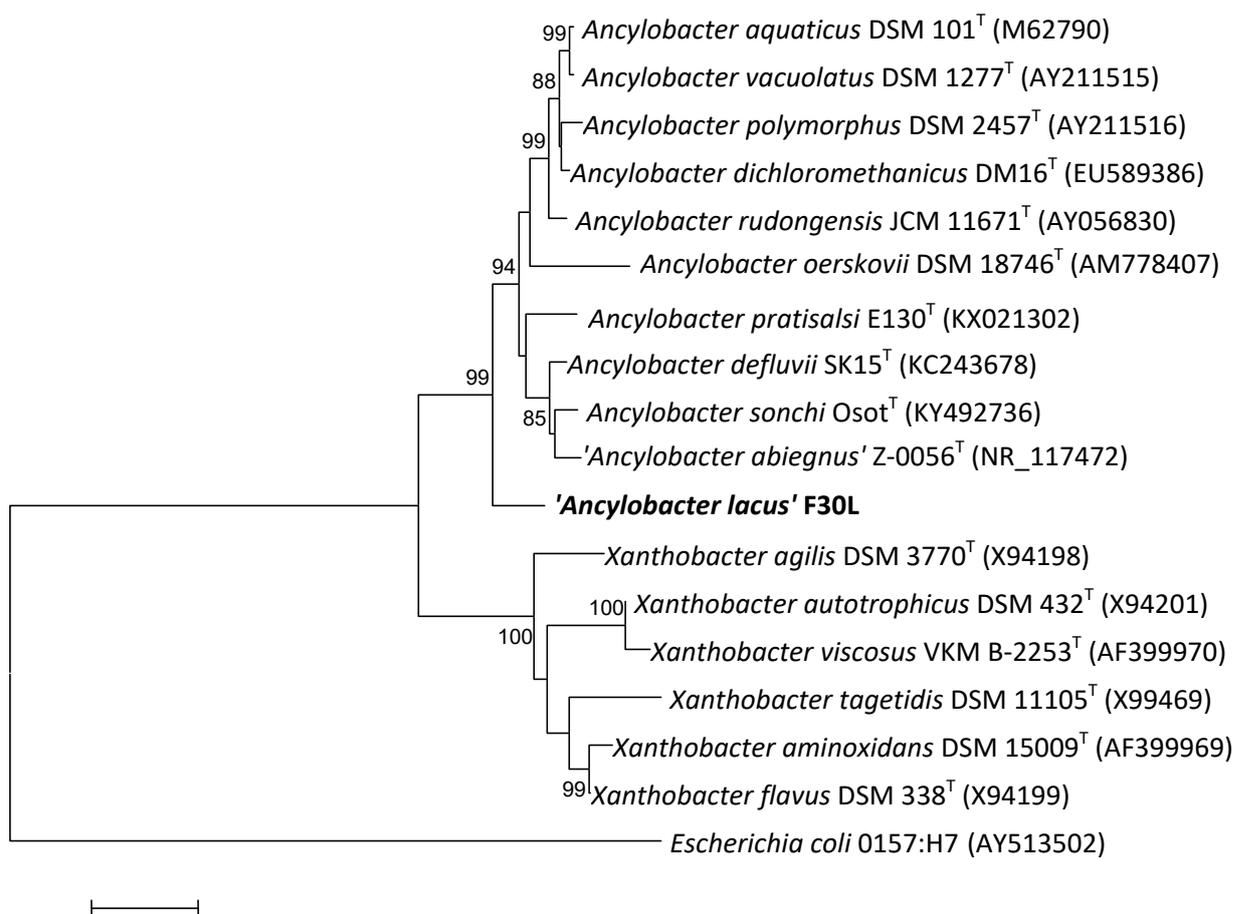


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма F30L, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние).

Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* 0157: H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

*Благодарим к.б.н. Полицеву В.Н. за проведение световой микроскопии и н.с. Присяжную Н.В. за регистрацию и анализ МАЛДИ масс-спектров.

Активный продуцент голубых оксидаз – аскомицет *Thielavia ovispora*

Шебанова А.Д.^{1,2}, Черных А.М.¹, Мясоедова Н.М.¹, Гайдина А.С.¹, Головлева Л.А.¹,
Коломыцева М.П.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

² ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, г. Тула,

anneteshebanova@mail.ru

Лакказы (бензендиол: кислород оксидоредуктаза, ЕС 1.10.3.2, “голубая” оксидаза) – медьсодержащий фермент, катализирующий четырехэлектронное окисление широкого ряда субстратов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Этот фермент обнаружен у бактерий, грибов, растений и насекомых (Мясоедова, 2015).

Лакказы являются одними из немногих оксидоредуктаз, активно используемых в качестве промышленных катализаторов в ряде технологий: пищевой промышленности, в производстве косметических препаратов; биосинтезе фармакологически ценных соединений; биоремедиации почв и стоков для детоксикации и деградации ксенобиотиков; целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей, текстильной промышленности. (Baldrian, 2006; Witayakran, 2009; Mate, 2017; Kudanga, 2017).

Была разработана схема очистки оксидаз из культуральной жидкости аскомицета *Thielavia ovispora*, полученной в ходе погруженного культивирования мицелия в жидкой минеральной среде с использованием растительных источников углерода и энергии. Очистку проводили с помощью 5 этапов с использованием анионообменной и гидрофобной хроматографий, а также гель- и ультрафильтраций. В результате было выделено два гомогенных ферментных препарата и определены кинетические и физико-химические свойства полученных голубых оксидаз.

Показана способность оксидаз гриба *T. ovispora* активно трансформировать малахитовый зеленый. Посредством ТСХ и Масс-спектрометрии были выделены и идентифицированы интермедиаты трансформации красителя.

С помощью вырожденных праймеров из геномной ДНК гриба *T. ovispora* была изолирована и идентифицирована частичная нуклеотидная последовательность гена лакказы. Осуществлен филогенетический анализ полученной нуклеотидной последовательности и ДНК и РНК последовательностей генов известных лакказ.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение №14.616.21.0001, RFMEFI61614X0001)

Литература

1. Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties: A review //FEMS Microbiology. – 2006. – Т. 30. – С. 215–242.
2. Kudanga T., Nemadziva B., Le Roes-Hill M. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Т. 101. – С. 13–33.
3. Mate D.M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. //Microbial Biotechnology. – 2017. – Т. 10. – С. 1457–1467.
4. Witayakran S., Ragauskas A.J. Synthetic applications of laccase in green chemistry: A review //Advanced Synthesis & Catalysis. – 2009. – Т. 351. – С. 1187–1209.

5. Мясоедова Н. М., Гасанов Н. Б., Черных А. М., Коломыцева М. П., Головлёва Л.А. Селективная регуляция продукции изоформ лакказы грибом *Lentinus strigosus* 1566. //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015 – Т. 51 № 2. – С. 221–228.

Изучение сортов ржи на устойчивость к спорынье *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. и содержания эргоалкалоидов в образцах склероций зерновых культур, собранных на территории Кировской области

**Шешегова Т.К.,^{1,2} Щеклеина Л.М.,²
Желифонова В.П.,³ Антипова Т.В.,³ Баскунов Б.П.,³ Козловский А.Г.³**

¹ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого», г. Киров, immunitet@fanc-sv.ru

²ФГБОУ ВО Вятская ГСХА, кафедра биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии, г. Киров

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пушкино

Фитопатогенный гриб *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. вызывает заболевание спорыньи у зерновых культур и злаковых трав в РФ и за рубежом. Цикл развития его складывается из трёх обособленных стадий: склероциальной, сумчатой (половая стадия) и конидиальной (бесполовая). Таким образом, у гриба имеется несколько инфекционных структур (склероции, головчатая строма с перитециями, сумка с сумкоспорами, грибница, конидиеносцы с конидиями), что значительно осложняет систему защиты со спорыньей. Склероциальная (зимующая) стадия и конидии на поверхности склероций являются единственной формой сохранения патогена в природе - в почве и семенном материале. Вредоносность спорыньи заключается в значительном снижении продуктивности растений из-за обеспложивания цветков. Кроме того, в рядом расположенных незараженных цветках наблюдается задержка развития завязи, в результате чего зерно формируется более мелкое и щуплое, что влечет за собой общее снижение урожайности зерновых культур.

Биологическая опасность спорыньи заключается также в возможности отравления людей и животных зерном и различными кормами, содержащими склероции патогена, токсические свойства которых обусловлены содержанием в них эргоалкалоидов (ЭА) разного строения. В результате у человека, животных и птицы проявляется эрготизм – общее название заболеваний, связанных с попаданием с пищей и кормами ЭА склероций спорыньи. Способность гриба *C. purpurea* продуцировать ЭА определенного состава является наследственно закрепленным признаком. Тем не менее, количественное и качественное содержание алкалоидов непостоянно и зависит от географического фактора, климатических условий и растения-хозяина. Спорынья проявляется в регионах с высокой влажностью воздуха (70% и выше) и умеренно теплой погодой (около 20°C) в период цветения растений. В Кировской области с 1998 по 2018 гг. поражение озимой ржи было в пределах от 0.2 до 1.7%. Аномальные по тепло-и влагообеспеченности условия вегетации 2017 г. (гидротермический коэффициент 2.13) спровоцировали сильнейшее развитие спорыньи, когда на отдельных производственных посевах этой культуры поражение было на уровне 3-5%. Фитопатологическая проблема спорыньи обостряется еще и в связи с ужесточением отечественного ГОСТа 16990-88 на рожь, который не допускает наличия склероций в оригинальных и семенах высших репродукций.

Целью наших исследований был поиск наиболее устойчивых сортов озимой ржи и изучение содержания и спектра эргоалкалоидов в разных образцах склероций.

Материалом исследований являлись 60 отечественных сортов озимой ржи, в том числе 25 – селекции ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока, которые ежегодно высевали на фитопатологическом участке на делянках площадью 1 м² в 3-х кратной повторности. В

начале колошения их инокулировали в цветок суспензией конидий *S. purpurea* в концентрации 10^5 спор/мл [1]. Для этого использовали патогенные штаммы местной популяции возбудителя, имеющиеся в рабочей коллекции лаборатории иммунитета и защиты растений ФАНЦ Северо-Востока. При полной спелости зерна оценивали поражение сортов по соотношению здоровых (без склероций) и больных (со склероциями) растений в анализируемой выборке (не менее 20 растений в каждой повторности), весовую массу зерна и склероций. Для биохимического анализа отобрали шесть образцов склероций, собранные на растениях озимой ржи, ярового ячменя, яровых и озимых форм пшеницы и тритикале. Склероции собирали на наиболее поражаемых сортах этих культур.

ЭА из измельченных склероций экстрагировали водным раствором ацетона при pH 4.5, затем водную фракцию доводили до pH 9-10 и экстрагировали хлороформом. ЭА обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха. Идентификацию метаболитов осуществляли сохроматографией со стандартными образцами и с помощью данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Количественное содержание суммарного количества ЭА в экстрактах склероций определяли спектрофотометрически.

Было обнаружено, что при искусственной инокуляции весь анализируемый генофонд озимой ржи в сильной степени восприимчив к спорынье. Можно лишь выявлять и отбирать наименее поражаемые сорта и отдельные биотипы. Среди сортов селекции ФАНЦ Северо-Востока, интерес для работы в данном направлении представляют районированные сорта Рада и Графиня и популяции, проходящие конкурсное испытание: Леда, Перепел, Графиня 2D, Флора и Флора Rfс. Поражение их в среднем за 5 лет изучения было на уровне 12.2-26.2%, а содержание склероций в зерновой массе 6.5-8.8%. Без искусственной инокуляции их можно отнести к среднеустойчивым (поражение до 3%). Состояние признаков у индикаторного сорта (наиболее восприимчивого в текущем году) было в среднем 58.8% и 31.7%. Из сортов других НИУ РФ относительно меньше поражались сорта: Татьяна, Московская 12, Памяти Кунакбаева, Антарес и Саратовская 7.

Установлено, также что в растительно-микробных взаимоотношениях «*Secale cereale* - *Claviceps purpurea*» велика роль климатических и случайных (неучтенных) факторов: доля фактора «год» в поражении растений составляет 36.6%, «сорта» – 17.1%, «неучтенных» – 40.9%. Это в целом затрудняет селекцию в данном направлении традиционными методами.

Изучение состава ЭА в шести образцах склероций показало, что спектр их был аналогичным и состоял из эргокрестина и его стереоизомера эргокрестинина. Содержание ЭА в 6-ти образцах склероций различалось в 3 раза от 0.3 до 0.9% от массы склероций. Различия в количестве ЭА могут быть связаны с использованием для опытов различных видов растений-хозяев. Наиболее высокое процентное соотношение ЭА было в склероциях, сформированных на ржи (0.8 и 0.9%) и яровой тритикале (0.9%), а наименьшее (0.3%) – на растениях перспективного сорта С-122 яровой пшеницы. Место сбора склероций не оказывало значительного влияния на количественный состав ЭА: у сорта ржи Кировская 89 в разных географических местах, удаленных на 150 км, содержание их было примерно на одном уровне.

Таким образом, одинаковый состав ЭА в склероциях разных видов злаковых культур, собранных в трех экологических точках Кировской области, может свидетельствовать о распространении на данной территории только одной расы гриба *S. purpurea*, для которой характерен биосинтез эргокрестина и эргокрестинина. Отсутствие высокоустойчивых к спорынье сортов ржи среди изученного генофонда культур предполагает расширить поиск путем иммунологического менеджмента коллекционных образцов, в том числе на фоне искусственных эпифитотий. В селекционном процессе должны ориентироваться на выявление и создание наименее поражаемых сортов и отдельных биотипов и, вероятно, использовании в работе других методов биотехнологии.

1. Шешегова Т.К, Щеклеина Л.М., Кедрова Л.И., Уткина Е.И. Селекция озимой ржи на устойчивость к спорынье: Методическое пособие. - Киров: ФГБОУ ВО Вятская ГСХА, 2018. – 27 с.

О роли гумусовых веществ в процессе биологической деструкции нефтезагрязнений

Шкидченко А.Н., Ахметов Л.И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, shkidchenko@gmail.com

При проведении работ по биоремедиации нефтезагрязнённых почв возникает вопрос о том, что в конечном итоге происходит с наиболее важной характеристикой восстанавливаемой почвы – плодородием, которое напрямую зависит от количества и качества гумусовых веществ. Образование гуминовых веществ в природных средах происходит в результате химического и биологического разложения растительных и животных остатков.

Гуминовые вещества обладают рядом свойств, которые должны способствовать их связыванию с органическими соединениями, в частности, углеводородами нефти. Данный процесс равносителен их выведению из свободного состояния и снижению негативного действия углеводородов на биоту.

Биодеградацию мазута, нефти и дизельного топлива (ДТ) осуществляли активными штаммами-микроорганизмов-нефтедеструкторов, предварительно отселекционированными в системе трёхстадийного проточного культивирования.

Для модельных почвенных экспериментов использовали серую лесную почву с внесением 5% указанных углеводородов. Система была открытой, нестерильной, влажность почвы поддерживали на уровне 60% от полной влагоёмкости при температуре 6С. Количественное определение содержания углеводородов проводили гравиметрическим методом. Определения содержания общего углерода почвенных образцов проводили методом Тюрина, определение гумусовых веществ в модификации Пономарёвой-Плотниковой. Изотопный состав углерода анализировали с помощью масс-спектрометра BREATMATplus (Германия).

Содержание углеводородов в почвенных образцах с увеличением времени до 100 сут во всех вариантах снижалось (рис. 1). Максимальную скорость биодеградации наблюдали в случае ДТ, минимальная – в варианте почвы, загрязнённой мазутом. Дополнительное инокулирование почвы микроорганизмами-нефтедеструкторами не интенсифицировало процесс. Увеличение времени экспозиции до 200 сут не сопровождалось снижением уровня нефтезагрязнения.

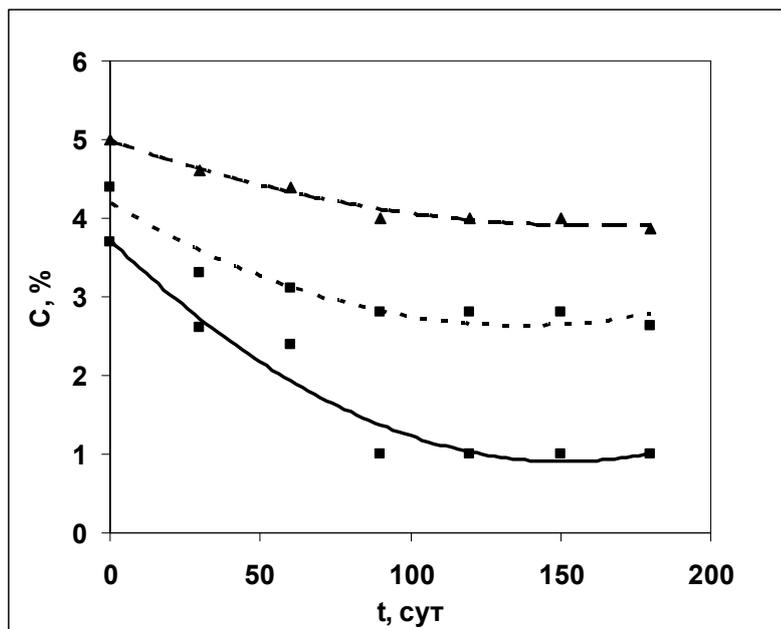


Рис. 1. Динамика убыли углеводородов нефти в почве (сплошная линия – дизтопливо, прерывистая линия – мазут, пунктирная линия - нефть)

В процессе биodeградации углеводородов нефти в почвенных образцах изменялось содержание гуминовых веществ: максимальное количество образовывалось в варианте с мазутом, несколько меньше – в вариантах с нефтью и мало изменялось в случае ДТ (рис. 2).

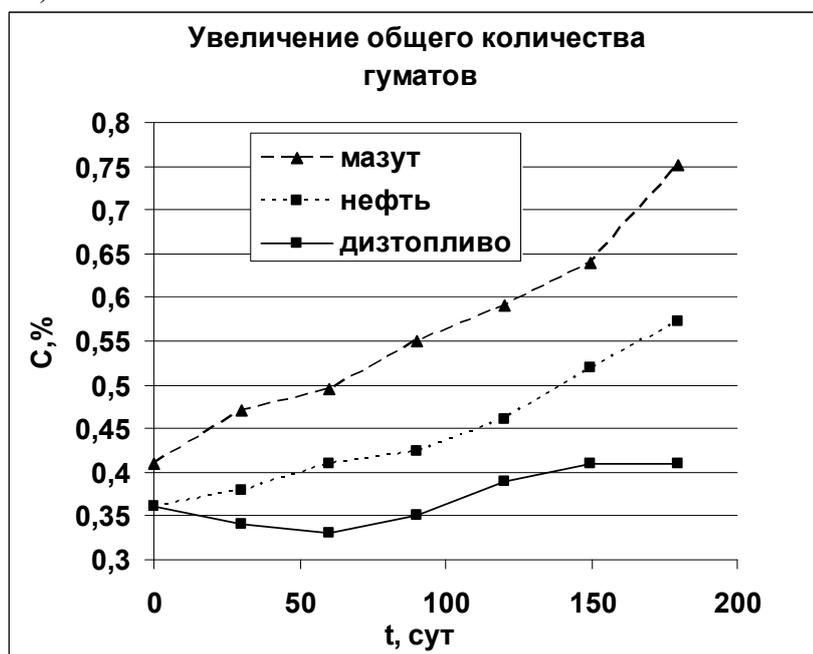


Рис. 2. Увеличение общего количества гуматов в почве при биodeградации углеводородов

Это легко объяснимо, т.к. при трёхстадийном проточном культивировании ДТ потреблялось полностью, нефть и мазут – частично. Исследование изотопного состава углерода в модельном (без микроорганизмов) эксперименте показали (табл.), что гуминовый комплекс почвы связывает 16% ДТ, 25.6% нефти и значительное количество мазута. Одна из растворимых фракций гуминового комплекса почвы, по-видимому, может полностью блокироваться лёгкими фракциями углеводородов нефти.

Табл. Результаты масс-спектрометрического анализа почвы и нефтепродуктов

№ образца	загрязнитель	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ в образце почвы после экстракции	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ в экстрактах углеводов из почвы
1	нефть, 5%	-27.57	-30.10
2	нефть, 1%	-27.70	-30.27
3	мазут, 5%	-27.89	-30.34
4	мазут, 1%	-27.56	-30.37
5	дизельное топливо, 5%	-27.59	-30.16
6	контроль без у/в	-27.04	—

Почва до внесения углеводов имела изотопный состав углерода $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ -27.04, а после экстракции нефтепродуктов около -27.6, т.е. разница соответствует количеству связываемых почвой углеводов. В процессе биодеструкции углеводов изменяются не только количественные, но и качественные характеристики изотопного состава углерода гуминовых веществ (исходная нефть до процесса биоремедиации имела значение изотопного состава -29.94), а после — -29.18. По-видимому, некоторые продукты, устойчивые к биодegradации, включаются в ароматический каркас гумусовых веществ в качестве углеводородной периферии.

Сравнительная характеристика фосфоноацетальдегид гидролаз у почвенных бактерий рода *Achromobacter*

Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.

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

Органофосфонаты (ОФ) – это вещества природного и антропогенного происхождения, входящие в большой класс фосфорорганических соединений и содержащие в своей структуре трудногидролизуемую ковалентную связь углерод-фосфор (С-Р). Ферменты, обеспечивающие разрыв С-Р связи, встречаются, в основном, у бактерий и представляют собой либо сложный мультиферментный комплекс «С-Р лиаза» с широкой субстратной специфичностью, либо одну или несколько узкоспецифичных С-Р гидролаз, среди которых важнейшую роль в метаболизме ОФ играет фосфоноацетальдегид гидролаза (фосфонатаза). Фосфонатаза впервые была обнаружена у *Bacillus cereus*, также фермент был выделен и изучен у *Salmonella typhimurium*. Несмотря на данные о возможном существенном разнообразии фосфонатаз у разных таксонов бактерий, систематического изучения данного вопроса не проводилось. До настоящего момента исследование подобных ферментов ограничивалось уточнением структуры активного центра и механизма реакции для фосфонатазы *B. cereus*, а также поиском генов, гомологичных кодирующему данную фосфонатазу гену *phnX* среди имеющихся в базах данных бактериальных геномов.

Значительная часть ОФ представлена ксенобиотиками – опасными загрязнителями окружающей среды, применяющимися как пестициды, смазки, хелатирующие агенты. Среди таких соединений наиболее распространен N-фосфонометилглицин, известный как «Глифосат» (ГФ) – действующий компонент многих неселективных гербицидов. По современным данным, ГФ опасен не только для растений, но также для животных и

человека, приводя к поражениям печени, кроветворения и нарушениям эмбрионального развития. В последнее время наблюдается бесконтрольное поступление данного гербицида в окружающую среду, чем объясняется возросший интерес к изучению путей метаболизма ГФ в научном сообществе. На сегодняшний день описано 2 пути биоразложения ГФ посредством бактериальных ферментных систем: 1) особая ГФ-специфичная С-Р лиаза и 2) ГФ-оксидоредуктаза. Имеются предварительные экспериментальные и литературные данные о том, что у ряда штаммов-деструкторов, таких как *Ochrobactrum anthropi* GPK3 и *Achromobacter* sp. Kg 16, терминальную стадию ГФ-оксидоредуктазного пути утилизации ГФ, связанную с непосредственным гидролизом С-Р связи, могут катализировать ферменты с фосфоацетальдегидгидролазной активностью, то есть фосфонатазы. Таким образом, фосфонатаза может играть ключевую роль в минерализации наиболее распространенного фосфонатного загрязнителя, и поэтому изучение разнообразия подобных ферментов среди бактерий-деструкторов ОФ имеет важное значение не только с фундаментальной, но и с прикладной точки зрения. В связи с этим целью настоящей работы является выделение и сравнительная характеристика фосфонатаз у представителей рода *Achromobacter*, выделенных из загрязненных ГФ почв и отличающихся высокой эффективностью деструкции данного загрязнителя. Поставленные задачи включали в себя отбор представителей рода *Achromobacter*, у которых обнаруживается фосфонатазная активность в гомогенатах клеток при росте на ГФ как единственном источнике фосфора; изучение условий индукции фосфонатаз у отобранных штаммов и подбор условий культивирования и разрушения биомассы, обеспечивающих наибольший выход ферментов; разработка схем очистки фосфонатаз до электрофоретически гомогенного состояния; определение основных характеристик выделенных ферментов в сравнении друг с другом и литературными данными.

Описанная в литературе фосфонатаза *V.cereus* представляла собой гомодимер с молекулярной массой (Mr) субъединицы около 30 кДа, функционировала в широком диапазоне значений pH (pH=8-9), обладала относительно высоким сродством к субстрату ($K_m=0,033$) и высокой максимальной скоростью реакции ($V_{max}=29,7$ Ед./мг белка). Белок элюировался с анионообменного носителя DEAE-Sephadex при концентрации NaCl равной 0,4 М. В литературе по умолчанию предполагается, что фосфонатазы бактерий дикого типа должны обладать сходной структурой и свойствами. Однако нами было показано, что даже в пределах одного рода *Achromobacter* наблюдается весьма значительная вариабельность фосфонатаз. Так очищенный ферментный препарат фосфонатазы штамма *Achromobacter* sp. Kg16, представлял собой мономер с молекулярной массой около 66 кДа, относительно высоким значением $K_m=0,889$ мМ, но в то же время низким значением $V_{max}=1,2$ Ед./мг белка, числом оборотов $k_{cat}=0,4$ с⁻¹, и каталитической эффективностью $k_{cat}/K_m=4,5 \times 10^2$ л моль⁻¹ с⁻¹. Элюция белка с анионообменного носителя DEAE-Toyorearl происходила при концентрации NaCl 0,13 М. У другого штамма-деструктора ГФ *Achromobacter* sp. Km11 фермент представлял собой гомодимер с Mr субъединицы около 25 кДа. Фермент проявлял большее сродство к фосфоацетальдегиду по сравнению с фосфонатазой *Achromobacter* sp. Kg16 ($K_m=0,466$ мМ), но весьма низкой максимальной скоростью реакции ($V_{max}=2,5 \times 10^{-2}$ Ед./мг белка), числом оборотов $k_{cat}=0,019$ с⁻¹, и каталитической эффективностью $k_{cat}/K_m=4 \times 10^{-2}$ л моль⁻¹ с⁻¹. Фермент элюировался с носителя DEAE-Toyorearl при концентрации NaCl 0,16 М.

Фосфонатаза у бактерии *Achromobacter* sp. Kg13 представляла собой мономер с Mr около 45 кДа, низким сродством к субстрату ($K_m=3,32$ мМ) и низким значением $V_{max}=7,2 \times 10^{-1}$ Ед./мг белка, числом оборотов $k_{cat}=0,53$ с⁻¹, каталитической эффективностью $k_{cat}/K_m=1,6 \times 10^{-1}$ л моль⁻¹ с⁻¹. Элюция с DEAE-Toyorearl происходила при концентрации NaCl 0,13 М.

У штамма-деструктора глифосата *Achromobacter* sp. Kg19 впервые было обнаружено наличие двух различающихся фосфонатаз в одной бактериальной клетке. Оба фермента

представляли собой мономеры с Mr около 66 кДа. Элюция первого ферментного препарата с фосфоацетальдегидгидролазной активностью с DEAE-Toyopearl происходила при концентрации NaCl 0,15 М, второго – при концентрации NaCl равной 0,34 М.

Таким образом, впервые показано существенное разнообразие фосфонатаз у представителей одного рода бактерий *Achromobacter*, в том числе наличие нескольких изоформ фермента у одного и того же штамма. Для изучения различий фосфонатаз у неродственных таксонов, аналогичные исследования проводятся с полученными из ВКМ представителями рода *Bacillus*, у которых продемонстрирована способность утилизировать ГФ как источник фосфора. Дальнейшая работа предполагает изучение субстратной специфичности выделенных ферментов, ингибиторный анализ, уточнение структуры и молекулярно-генетические исследования для определения гомологии новых фосфонатаз с ранее описанными аналогами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №18-74-00021



Okabiolab

ВСЁ ДЛЯ НАУКИ

www.okabiolab.ru

+7(495)502-59-93

+7(4967)33-06-09

E-mail: info@okabiolab.ru

ВСЁ ДЛЯ НАУКИ!

Мы оснастим лабораторию для Ваших открытий



На рынке
с 2005 года



Более 300 000
наименований



10 кандидатов
наук и магистров

С нами Вы экономите
время и средства на
закупках для
лаборатории

- Быстрый и точный подбор оборудования
- Бухгалтерская и юридическая поддержка сделок
- Любые объемы поставок, от одной колбы
- Консультации и технический надзор
- Гарантийное и сервисное обслуживание



Оборудование и материалы для решения Ваших задач



клеточная
биология



ПЦР



иммуноферментный
анализ



микроскопия



молекулярная
биология



электрофорез



биотехнологическое
производство



хроматография



