**ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН**
**ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН**
**Пермский ФИЦ УрО РАН**

# VII ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»

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

***6-9 декабря 2021 г.***

Сборник материалов конференции

Пущино
2021

УДК 579.2
ББК 28.4

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

VII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. М.: ГЕОС, 2021. 302 с.

ISBN 978-5-89118-845-7

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

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

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

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

ISBN 978-5-89118-845-7

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН

# СОДЕРЖАНИЕ

Содержание ..... 3

***СЕКЦИЯ 1.***
***МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ*** ..... 14

Новый род актинобактерий в семействе *Jiangellaceae*
*Автух А.Н., Дорофеева Л.В., Арискина Е.В., Дущанова К.С., Барышникова Л.М., Евтушенко Л.И.* ..... 14

Новый вид рода *Methyloligella* и предложение нового семейства *Methyloligellaceae* fam.nov.
*Агафонова Н.В., Груздев Д.С., Капаруллина Е.Н. , Доронина Н.В.* ..... 15

Исследование генов резистентности к тетрациклину бактерий промышленных экосистем
*Адельгареева А.Ю., Маркушева Т.В.* ..... 17

Антимикробная активность водных экстрактов растений вида *Nuphar lutea (L.) Smith*,1809
*Блидина А.И., Зубова К.В., Басалаева Д.Л., Седова О.В.* ..... 18

Никелевая пена как новый материал подложки амперометрических бактериальных биосенсоров
*Быков А.Г., Решетилов А.Н.* ..... 19

Сорбционная биоремедиация нефтезагрязненных почв в разных почвенно-климатических условиях Российской Федерации
*Васильева Г.К., Михедова Е.Е., Стрижакова Е.Р., Филонов А.Е., Ахметов Л.А.* ..... 21

Микробное разнообразие филлопланы и концентрация тяжелых металлов в окружающей среде: влияние расстояния от дороги с интенсивным движением
*Ветрова А., Сазонова О., Иващенко К., Корнейкова М., Ермакова А., Константинов П., Сотникова Ю., Сошина А., Васильева М., Васенев В., Гавричкова О.* ..... 23

Молекулярно-генетический анализ микробных сообществ подземных вод города Москвы, подверженных антропогенному воздействию
*Груздев Е.В., Кадников В.В., Белецкий А.В., Бегматов Ш.А., Марданов А.В., Равин Н.В.* ..... 24

Ростостимулирующий эффект суспензии микроводоросли *Chlorella vulgaris* при выращивании томата в условиях закрытого грунта
*Доренская А.Ю.* ..... 26

Влияние 3D-нанокомпозитов $Al_2O_3/TiO_2$ на фитопатогенные микроорганизмы *Pseudomonas sp*.
*Дорошенко А.А., Тучина Е.С.* ..... 28

Рамнозосодержащие гликополимеры клеточных стенок представителей семейства *Microbacteriaceae*
*Зайчиков В.А., Ким Д., Потехина Н.В., Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* ..... 30

Бесфосфатные гликополимеры в таксономии рода *Rathayibacter*
*Зайчиков В.А., Потехина Н.В., Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* ..... 32

Описание двух новых подвидов в рамках вида *Trichococcus shcherbakoviae*
*Захарюк А.Г., Щербакова В.А.* ..... 33

Подтверждение концепции механизмов адаптивных структурных перестроек плазмалеммы дрожжей при росте на гидрофобных субстратах на основе результатов ультраструктурного анализа, полученных методом крио-замещения (Freeze – Substitition) и криофрактографии (Freeze – Fracture)
*Звонарев А.Н., Русакова Т.Г., Дмитриев В.В.* ....35

Микроорганизмы корневой зоны *Miscanthus* × *giganteus*, проявляющие устойчивость к тяжелым металлам и стимулирующий рост растений потенциал
*Зеленова Н.А., Муратова А.Ю., Плешакова Е.В.* ....38

Микробная железоредукция в арктических пробах, сопряженная с образованием метана
*Зиновьева О.В., Захарюк А.Г., Щербакова В.А.* ....40

Микроорганизмы-деструкторы ароматических углеводородов в градиенте функциональных зон города Москва
*Иванова А.А., Ветрова А.А., Сазонова О.И., Петриков К.В., Стрелецкий Р.А., Саржанов Д.А., Корнейкова М.В., Гавричкова О.В.* ....42

Вклад очистных сооружений г. Пущино в загрязнение поверхностных вод реки Ока антибиотикорезистентными микроорганизмами
*Измалкова Т. Ю., Сазонова О.И., Воронкова А.Д., Кошелева И.А.* ....44

Динамика комплексов микромицетов в процессе зарастания угольных отвалов угольных шахт в районе г. Воркута
*Ильюшин В.А.* ....45

Характеристика и геномный анализ бактериофага *Pseudomonas* Pf-10
*Казанцева О.А., Бузиков Р.Б., Пилипчук Т.А., Валентовия Л.Н., Коломиец Э.И., Шадрин А.М.* ....46

Выделение и характеристика умеренного бактериофага B13, инфицирующего бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato*
*Казанцева О.А., Пилигримова Э.Г., Шадрин А.М.* ....48

Гликополимеры клеточной стенки – хемотаксономический маркер актинобактерий рода *Clavibacter*
*Ким Д., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* ....50

Метаболический потенциал кишечного микробиома подростков с ожирением и нормальной массой тела
*Клименко Е.С., Белькова Н.Л., Романица А.И., Погодина А.В., Рычкова Л.В.* ....52

Разнообразие прокариотных сообществ аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов под тропическим лесом (заповедник Пу Хоат, Вьетнам)
*Князева А.В., Лысак Л.В.* ....53

Выявление гидролитических ферментов *Vibrio cholerae* и *Francisella tularensis* в субстратном электрофорезе
*Козлов С.Н., Николаев В.Б., Корнева А.В., Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.* ....55

Антибактериальные эффекты лантибиотиков в отношении представителей рода *Listeria*
*Коробов В.П., Полюдова Т.В., Суздальцева А.В., Борзенков В.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.* ....57

Изменение азотфиксирующей активности ризобий в клубеньках в зависимости от стадии вегетации растения-хозяина
*Коряков И.С., Акимова Е.С., Владимирова А.А., Баймиев Ан. Х.* ....59

Изучение микробных сообществ хемоземов озера Атаманское Ростовской области
*Кочаровская Ю.Н., Делеган Я.А., Минкина Т.М., Дудникова Т.С., Сушкова С.Н.* ....60

Разнообразие микробиома толстой кишки при язвенном колите: молекулярно-генетический подход и прикладное значение
*Круглов Е.Е.* ....62

Метаболические пути и энергетический баланс окисления лактата различными микроорганизмами
*Минкевич И.Г., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.* ....64

Индикаторные микроорганизмы почв вблизи железнодорожных станций на территории г. Саратова
*Мурзина Ю.И., Коробейникова А.С., Глинская Е.В., Нечаева О.В.* ....66

Культивируемые бактерии из осадков техногенного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения солей
*Нечаева Ю.И., Алеев В.С., Белкин П.А., Плотникова Е.Г.* ....67

Особенности эволюции вирусов бактерий подсемейства *Tevenvirinae*
*Никулин Н.А., Зимин А.А.* ....68

Бактерии микробных сообществ растений, пораженных фитопаразитическими членистоногими
*Оспенников Ю.В., Демидов А.В., Присяжная Н.В., Дорофеева Л.В., Чижов В.Н., Субботин С.А., Евтушенко Л.И.* ....70

Особенности симбиоза зеленой микроводоросли *Trebouxia sp.* с микобионтом в лишайнике *Parmelia sulcata*
*Павлова Е.А., Маслов А.И.* ....71

Новая термофильная метаноархея из подземной биосферы
*Петров П. Д., Трубицын В.Э., Ошуркова В. И.* ....72

Метагеномный анализ в изучении бактериальных сообществ прибрежных акваторий Японского моря
*Писарева Е.О., Богатыренко Е.А., Дункай Т.И.* ....74

Устойчивость цианобактерий к загрязнителям как характеристика условий обитания на примере *Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek
*Пичугина Е.К., Беандруна Суандзара Родлиш, Бенитсиафантука Элид Ульрих, Федоров А.С., Годой Гуадамус Пабло, Мазина С.Е.* ....75

*Corynebacterium sanguinis* – новый представитель сапрофитной микрофлоры кожи лица
*Полюдова Т.В., Пьянкова А.А., Ерошенко Д.В.* ....77

Распространение и разнообразие микробного сообщества термального источника Ерo, Монголия
*Раднагуруева А.А., Цыренова Д.Д., Ткачев П.А., Лаврентьева Е.В., Бархутова Д.Д.* ....78

Сульфатредуцирующие бактерии донных осадков северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря
*Рыжманова Я.В., Пономарева А.Л., Щербакова В.А.* ....80

Культивируемые микроскопические грибы в фито-очистных сооружениях разных географических регионов на примере Франции и Таиланда
*Сайнчук А.Д., Александрова А.В., Харитонов С.Л., Щеголькова Н.М.* ....82

Микробное разнообразие верхних горизонтов водной толщи открытой части Кандалакшского залива Белого моря
*Салова В.Д., Гавирова Л.А.* ....84

Выделение и идентификация бактерий, устойчивых к тяжелым металлам, из сточных вод и ила очистных сооружений г. Тула
*Сизова О.И., Переломов Л.В., Кочетков В.В.* ....85

Динамическая микроэкология и эволюционная биология развития: подходы и перспективы
*Скобликов Н.Э., Зимин А.А.* ....87

Морфологическая характеристика грибов-деструкторов темперной живописи при их росте на агаризованных средах
*Сорокина Е.А., Кукушкина В.И., Авданина Д.А., Жгун А.А.* ....88

Сравнительная характеристика антибактериального действия наночастиц йода и теллура на грамотрицательные микроорганизмы (на примере *Escherichia coli*) в качестве перспективной альтернативы антимикробным препаратам
*Стрекаловская Е.И., Звягинцева Н.Д., Танцырев А.П., Буковская Н.Е., Балханова Т.И.* ....91

Экологическая адаптация грибов рода *Alternaria* к различным биотопам яблонь
*Султанова О.О., Петерсон А.М.* ....93
Динамика микробиологических показателей цепи Карасунских озёр города Краснодар за 2020–2021 гг.
*Супрун И.В., Мелконян К.К., Табачникова А.А., Волченко Н.Н.* ....95
Оценка применения микробиологического удобрения «Байкал эм-1» на рост и развитие *Pisum Sativum*
*Сутулина Ю.А.* ....96
Современная таксономия водорослей: успехи и проблемы делимитации видов
*Темралеева А.Д.* ....97
Дрожжевые сообщества почв города Москвы
*Тепеева А.Н., Глушакова А.М., Качалкин А.В.* ....99
Первая ацетогенная бактерия, выделенная из арктического криопэга
*Трофимов А.С., Рыжманова Я.В., Сузина Н.Е., Щербакова В.А.* ....99
Характеристика генома новой водородпотребляющей метаногенной археи из вечной мерзлоты
*Трубицын В.Э., Щербакова В.А.* ....101
Консорциум фосфатаккумулирующих бактерий из активного ила биологических очистных сооружений
*Хасанова А.А., Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Хафизова И.С., Сироткин А.С.* ....103
Сравнение активности роста *Rhodococcus erythropolis* B2 при различных вариантах культивирования
*Худякова Ю.Е., Потапова Л.С.* ....104
Функциональные» гены НАД (+) – зависимых формиатдегидрогеназ в таксономии метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*
*Чемодурова А.А., Решетников А.С., Доронина Н.В.* ....105
Система огурец обыкновенный – бахчевая тля – чёрные садовые муравьи как резервуар сапрофитических и фитопатогенных микроорганизмов
*Шьюрова А.А., Петерсон А.М.* ....107
Систематика прокариот в постгеномную эру
*Щербакова В.А.* ....109
Филогения прокариот как референтная структура для исследования эволюции ферментов энергетического метаболизма
*Янюшин М.Ф.* ....110
Бактерии рода *Micrococcus*, выделенные из соляной породы Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей
*Ястребова О.В., Пьянкова А.А.* ....112

***СЕКЦИЯ 2.***
***БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ*** ....114

Особенности ультраструктурной организации нового изолята хищной грамположительной ультрамикробактерии рода *Microbacterium*, шт. Ltr1-эпибионта поверхностного покрова личинки тритона
*Абашина Т.Н., Шорохова А.П., Поливцева В.Н., Носков А.Е., Звонарев А.Н., Сузина Н.Е.* ....114
Сверхэкспрессия полифосфатаз Ppn1 и Ddp1 повышает устойчивость клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к перекисному и марганцевому стрессам
*Андреева Н.А., Ледова Л.А., Трилисенко Л.В., Рязанова Л.П., Кулаковская Т.В.* ....116
Филогеномное дерево класса пезизовых (Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka), построенное по всем доступным пятидесяти двум геномным сборкам
*Арзамасцева В.О., Тепеева А.Н., Василенко О.В.* ....117

Цитотоксические свойства киллер-токсина дрожжей *Yarrowia lipolytica*
*Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.* ..... 119

Дыхательная цепь грибов и дрожжей как мишень действия стресс-факторов
*Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.* ..... 121

Характеристика рекомбинантной метакрилатредуктазы RMrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1
*Архипова О.В., Таухутдинова С.Р., Ашин В.В., Захарова М.В., Микулинская Г.В., Молочков Н.В., Кутышенко В.П., Прохоров Д.А.* ..... 123

Секвенирование и анализ генома бактерии *Marinobacterium sp.* OS 208 (KMM 9957), выделенной из донных осадков Охотского моря
*Балдаев С.Н., Отставных Н.Ю., Романенко Л.А., Исаева М.П.* ..... 124

Тест MPL Express SARS-CoV-2 FF для обнаружения РНК вирусов в пробе пациента
*Башкиров В.И., Гуторов М.А., Усвалиев А.Д.* ..... 125

Функциональные гены бактерий, выделенных из акваторий Японского моря, ответственные за деструкцию ПАУ
*Богатыренко Е.А., Ким А.В., Медведева А.Д., Дашков Д.В., Дункай Т.И.* ..... 127

Выявление генов, характерных для бактерий, обладающих стероидным катаболизмом
*Брагин Е.Ю., Довбня Д.В., Донова М.В.* ..... 129

Секвенирование и анализ генома альфапротеобактерии KMM 6723, выделенной из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*
*Быстрицкая Е.П., Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Исаева М.П.* ..... 130

Конфликт концепции типового образца в систематике грибов в геномную эру и способы его преодоления
*Василенко О.В., Тепеева А.Н., Арзамасцева В.О.* ..... 131

Регуляция первичного некроза в дрожжах *S.cerevisiae* внеклеточным pH и экзогенным $K^+$
*Валиахметов А.Я.* ..... 132

Замена K320N в хеликазном домене Cas3 влияет на выбор спейсеров в ходе праймированной адаптации и на эффективность интерференции в системе CRISPR-Cas I-E *Escherichia coli*
*Ваулин Н.С., Ширяева А.А., Северинов К.В.* ..... 134

Искусственно синтезированные гены фитохелатинов для эффективного связывания тяжелых металлов растениями
*Вершинина З.Р., Таминдарова Д.А., Саитгареева А.Л., Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Масленникова Д.Р.* ..... 136

Исследование ранней фазы ответа на голодание по источнику углерода и энергии у растущих культур *Bacillus subtilis*
*Габова А.О., Чурин Г.Ю., Тюленев А.В.* ..... 137

Секвенирование длинных прочтений по технологии Oxford Nanopore – эффективный инструмент для изучения организации бактериальных геномов с вариабельной структурой
*Делеган Я.А., Кочаровская Ю.Н., Французова Е.Э., Соляникова И.П.* ..... 139

Инженерия микробных продуцентов ценных изопреноидных синтонов на основе актинобактерий рода *Mycolicibacterium*
*Донова М.В., Ивашина Т.В., Довбня Д.В., Карпов М.В., Брагин Е.Ю., Стрижов Н.И.* ..... 140

Гипертермофильная архея *Thermococcus sibiricus* – источник высокостабильной L-аспарагиназы для биомедицины и пищевых технологий
*Думина М.В., Жгун А.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Жданов Д.Д., Соколов Н.Н., Эльдаров М.А.* ..... 141

Роль малил-КоА лиазы – фермента серинового цикла ассимиляции углерода – у метанотрофов, реализующих различные варианты С1-ассимиляции
*Егорова С.В., Бут С.Ю.* ..... 144

Ключевые изменения, происходящие в геномах грибных продуцентов вторичных метаболитов после улучшений классическим методом
*Жгун А.А.* ..... 146

Поиск и определение консервативности некодирующих РНК, участвующих в регуляции метаболизма азота, в геноме *Pseudomonas putida* BS3701
*Иванова Е.В., Позднякова-Филатова И.Ю.* ..... 148

Эволюционная стабильность микроорганизма глубинной подземной биосферы
*Кадников В.В., Марданов А.В., Карначук О.В., Равин Н.В.* ..... 149

Конструирование химерных белков иммунитета Im9, чувствительных к протеазе pS273R вируса африканской чумы свиней
*Калинин Д.С., Ефимов А.В., Каява А.В., Шляпников М.Г., Соловьев И.Д., Грановский И.Э.* ..... 151

Проблема недостаточности данных в Генбанке NCBI
*Калинина А.Е., Кудряшова Т.Р., Филатов П.В., Аронова Е.Б., Крюков А.А., Юрков А.П.* ..... 152

Секвенирование генома и анализ путей первичного метаболизма метанола у нового представителя рода *Ancylobacter*
*Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Агафонова Н.В., Доронина В.Н.* ..... 153

Оптимизация процедуры выделения РНК из углеводородокисляющих родококков
*Комарова Л.П., Ширяева Е.Н., Криворучко А.В., Ившина И.Б.* ..... 154

Выделение и характеристика состава капсульного полисахарида и липополисахарида почвенных ростстимулирующих ассоциативных бактерий *Azospirillum griseum* L-25-5 w-1
*Кондюрина Н.К., Сигида Е.Н., Бурыгин Г.Л., Федоненко Ю.П.* ..... 156

Молекулярные факторы адгезии углеводородокисляющих родококков
*Криворучко А.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б.* ..... 157

Экофизиологические свойства штаммов *Aspergillus niger*, выделенных из облученных и необлученных образцов пустынных почв
*Крючкова М.О., Иванова А.Е., Воробьёва Е.А.* ..... 159

Разработка гомологичной системы экспрессии для β-литической протеазы *L. capsici* VKM B-2533$^{T}$
*Кудрякова И.В., Афошин А.С., Леонтьевская Е.А., Леонтьевская Н.В.* ..... 161

Анализ экспрессии нескольких SWEET-генов транспортеров сахаров у *Medicago lupulina* в процессе развития эффективной арбускулярной микоризы в условии стресс-фактора
*Кудряшова Т.Р., Калинина А.Е., Филатов П.В., Крюков А.А., Горбунова А.О., Иванченко О.Б., Юрков А.П.* ..... 162

Сравнение кинетических параметров РНКазы H фага T4 дикого типа и её DAS-мутанта
*Кузницын Р.А., Холод Н.С., Марченков В.В., Майоров С.Г., Грановский И.Э.* ..... 163

Изменение регуляции биосинтеза полиаминов у высокоактивного штамма *Acremonium chrysogenum*, продуцента цефалоспорина С
*Кукушкина В.И., Карпова Н.В., Нураева Г.К., Январев Д.В., Хомутов М.А., Жгун А.А.* ..... 164

ДНК-связывающие белки системы арбитриум бактериофага vB_BtS_B83
*Кулябин В.А., Шадрин А.М.* ..... 166

Роль лакказы зигомицетного гриба *Mortierella elasson* ВКМ F-1406 в деградации гуминовых кислот
*Лисов А.В., Белова О.В., Заварзина А.Г., Константинов А.И., Леонтьевский А.А.* ..... 168

Секвенирование и анализ генома бактерии *Vibrio sp.* CB2-10, выделенной из морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*
*Личманюк Д.О., Отставных Н.Ю., Куриленко В.В., Исаева М.П.* ..... 169

Укороченный с N-конца природный вариант *Hly*II *B. cereus* обеспечивает адгезию эритроцитов
*Лучкина П.Н., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Замятина А.В., Каратовская А.П., Руденко Н.В., Солонин А.С.* ..... 170

Деградация углеводородов штаммом *Pseudomonas veronii* 7-41 в моно- и бисубстратных системах
*Муллаева С.А., Иванова А.А., Сазонова О.И., Петриков К.В., Делеган Я.А., Стрелецкий. Р.А., Ветрова А.А.* ....171

Оптимизация технологии получения рекомбинантного аннексина V, меченного FITC, для количественной детекции апоптоза в клетках эукариот
*Новикова Н.И., Калинин Д.С., Майоров С.Г., Валиахметов А.Я., Грановский И.Э., Земскова М.Ю.* ....172

Молекулярно-генетическая характеристика бактерий рода *Zobellia*: молекулярное типирование и геномный анализ
*Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Михайлов В.В., Исаева М.П.* ....173

Механизмы адаптации представителей рода *Acinetobacter*
*Петрова М.А., Миндлин С.З.* ....174

Флуоресцентная микроскопия микроорганизмов, сопряженная с компьютерной обработкой и анализом изображений
*Пучков Е.О.* ....175

Новые лакказные гены аскомицетов рода *Myrothecium* и *Curvularia*
*Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Егорова А.Д., Коломыцева М.П.* ....177

Гетерологическая экспрессия катехол 1,2-диоксигеназы бактерии *Rhodococcus opacus* 1CP
*Ренфельд Ж.В., Шайфутдинов Р.Р., Черных А.М., Коломыцева М.П.* ....178

Формирование трехмерных структур из клеток млекопитающих под воздействием полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты
*Рысцов Г.К., Лисов А.В., Земскова М.Ю.* ....179

Новые оксидоредуктазы органофосфонатов у почвенных бактерий *Achromobacter* и *Ochrobactrum*: неизвестные ферменты известных метаболических путей
*Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А.* ....181

Действие наночастиц алмаза и графита на биологические системы штамма *Escherichia coli* K12 TGI
*Сорокина Е.В., Образцова Е.А.* ....183

Жирнокислотный состав бактерий рода *Rhodococcus* – один из маркеров адаптации к пониженным температурам
*Суворова В.В., Колыхалов Д.А.* ....185

Получение рекомбинантных микробных родопсинов представителей семейства Geodermatophilaceae
*Тарлачков С.В., Стародумова И.П., Буева О.В., Шевчук Т.В.* ....186

Определение чувствительности *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* к препарату «Арбидол»
*Титова Т.Ю., Улыбина А.В.* ....188

Особенности физиологии штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с нокаутом гена полифосфатсинтетазы Vtc4
*Томашевский А.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В.* ....190

Действие оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на мутанты *Escherichia coli menA* и *ubiC*
*Триандафилова Г.А., Тюленев А.В., Красных О.П., Смирнова Г.А., Октябрьский О.Н.* ....191

Сайт-направленный мутагенез двухдоменной бактериальной лакказы из *Streptomyces carpinensis*
*Трубицина Л.И., Абдуллатыпов А.В., Трубицин И.В., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.* ....193

Real-time мониторинг физиологических параметров аэробно растущих бактерий *Escherichia coli* при пероксидном стрессе
*Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., Габова А.О.* ....194

Динамики низкомолекулярных неорганических соединений серы ($SO_3^{2-}$, $H_2S$) в растущих культурах *Bacillus subtilis* при действии антибиотиков (тетрациклин, эритромицин, канамицин)
*Ушаков В.Ю., Чурин Г.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.* ....196

Делеция гена *PHO91,* кодирующего переносчик фосфата вакуолярной мембраны, приводит к нарушению способности потреблять метанол клетками метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha*
*Фарофонова В.В., Карагинов А.В., Агафонов М.О., Кулаковская Т.В.* ....198

Конструирование праймеров к генам интереса, кодирующих аквапорины для проведения ПЦР
*Филатов П.В., Калинина А.Е., Кудряшова Т.Р., Крюков А.А., Аронова Е.Б., Юрков А.П.* ....200

Лантан-зависимая регуляция генов метанолдегидрогеназ *Methylorubrum extorquens* DM4
*Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.* ....201

Анализ дифференциальной экспрессии генов, вовлеченных в катаболизм дибензотиофена штаммом *Gordonia alkanivorans* 135
*Французова Е.Э., Позднякова-Филатова И.Ю., Делеган Я.А.* ....203

Полипептиды HlyII, укороченные с N-конца способны подавлять гемолитическую активность HlyII *B. cereus*
*Хлебалина Н.А., Сиунов А.В., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Мельник Б.С., Колесников А.С., Замятина А. В., Каратовская А.П., Руденко Н.В., Борисова М.П., Солонин А.С.* ....204

Изучение роли клеточных нуклеаз в праймированной адаптации в системе CRISPR-Cas I-E
*Цой Ю, Фёдоров И.А., Ширяева А.А., Северинов К.В.* ....205

Продукция биопав и рост нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus erythropolis* f2-2 при культивировании на гексадекане или глюкозе
*Чайка Н.Я., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е.* ....206

Секвенирование и анализ генома бактерии *Celeribacter sp.* КММ 6765, выделенной из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*
*Чаусова В.Е., Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Исаева М.П.* ....208

***СЕКЦИЯ 3.***
***БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ*** ....210

Использование генетических и энологических маркеров при селекции отечественных штаммов дрожжей-сахаромицетов, для адаптации к хересному виноделию
*Авданина Д.А., Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Иванова Е.В., Шаламитский М.Ю., Загоруйко В.И., Равин Н.В., Марданов А.В., Эльдаров М.А.* ....210

Биотехнологический потенциал бактерий, выделенных из биотопов района промышленных солеразработок Верхнекамского соленосного бассейна
*Ананьина Л. Н., Шестакова Е.А., Горбунов А.А.* ....212

Характеристика новых бактериальных штаммов, способных к биоконтролю фитопатогенных микроорганизмов
*Анохина Т.О., Есикова Т.З., Абашина Т.Н., Соляникова И.П.* ....214

Меллеолиды грибов комплекса *Armillaria mellea* sensu lato (s. l.), выделенных в Сибири и Крыму
*Антипова Т.В., Желифонова В.П., Литовка Ю.А., Павлов И.Н. , Баскунов Б.П., Маколова П.В., Тимофеев А.А., Козловский А.Г.* ....216

Мицелиальные актинобактерии как потенциальные биодеструкторы углеводородоров нефти
*Бабич Т.Л., Грачёва Т.А., Зотова А.Н.* ....218

Термостабильность метанолдегидрогеназы, выделенной из *Methylobacterium extorquens pcm160*
*Баклагина С.П.* ....219

Микробные сообщества активных илов сооружений по очистке сточных вод города Москвы
*Бегматов Ш.А., Дорофеев А.Г., Кадников В.В., Белецкий А.В., Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В.* ....220

Изучение основных характеристик штамма микроорганизма выделенного с листьев ячменя
*Гасиева З.А., Кудрявцев Д.В., Галушко А.С., Иванченко О.Б., Панова Г.Г.* ....221

Влияние некоторых ионов тяжёлых металлов на биоэлеткрогенез микробных топливных элементов
*Гасюк О.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Самков А.А., Худокормов А.А.* ....223

Эффективность использования криопротектора на основе смектита для пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*
*Дбар С.Д., Сорокина Е.В., Стоянова Л.Г.* ....224

Трансформация холевой кислоты психрофильными бактериями родов *Psychrobacter* и *Arthrobacter*
*Дещеревская Н.О., Казанцев А.В., Донова М.В.* ....226

Биодеструкторы афлатоксина В1 и ингибиторы его биосинтеза у токсигенных аспергиллов – возможное решение проблем загрязнения сельскохозяйственной продукции
*Джавахия В.Г.* ....228

Применение грибных оксидазных препаратов для биоремедиации почвенных и водных систем
*Егорова А.Д., Черных А.М., Ренфельд Ж.В., Коломыцева М.П.* ....230

Исследование гидролазной активности бактерий в отношении промышленных полимерных материалов
*Егорова А.Д., Серёгина К.К., Черных А.М., Ренфельд Ж.В., Коломыцева М.П.* ....231

Характеристика штамма *Pseudomonas putida* СТ3, обладающего уникальной способностью к деградации *epsilon*-капролактама, толуола и *мета*-ксилола
*Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Анохина Т.О.* ....233

Разработка систем экспрессного контроля и деградации додецилсульфата натрия на основе электрооптического датчика и грамотрицательных микроорганизмов *Herbaspirillum lusitanum* Р6-12
*Жданова Е.С., Каневский М.В., Величко Н.С.* ....234

Особенности образования монасникотиновой кислоты грибом *Aspergillus cavernicola*
*Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зайцев К.В., Баскунов Б.П., Козловский А.Г.* ....236

Оценка потенциальной фосфат-мобилизующей способности штаммов *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas fluorescens* ПГ7 при культивировании на элективных питательных средах *in vitro*
*Калинина Т.В., Железняков С.В., Деева В.К., Попова Т.А., Лактионов Ю.В., Якоби Л.М.* ....237

Биосинтез изолимонной кислоты из спиртсодержащих отходов с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*
*Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А., Моргунов И.Г.* ....239

Выделение из высокомагнитной почвы марганецокисляющих микроорганизмов и оценка уровня их устойчивости к марганцу
*Касаткина М.А., Нгун К.Т., Плешакова Е.В.* ....240

Оптимизация температурных условий для синтеза ферментов дрожжами
*Кирюхина А.С.* ....242

Влияние внеклеточных лектинов на седиментационные свойства активного ила
*Клементьев С.В., Кобелев А.В., Сироткин А.С.* ....244

Использование иммобилизованных в Са-альгинатные шарики клеток *Azospirillum brasilense* в реакциях деколоризации малахитового зеленого
*Ковриженков А.В., Авдеева Е.С., Купряшина М.А.* ....246

17β-Гидроксистероид дегидрогеназная и 7-гидроксилазная активность грибного штамма *Drechslera* sp.: специфичность, индуцибельность, транскриптомный анализ
*Коллеров В.В., Шутов А.А., Тарлачков С.В., Донова М.В.* ....247

Влияние рутина на деградацию полициклического ароматического углеводорода ризосферным штаммом *Mycolicibacterium gilvum*
*Кузянов Д.А., Плешакова Е.В., Панченко Л.В., Муратова А.Ю.* ....249

Конверсия холестерина термофильными актинобактериями
*Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Донова М.В.* ....251

Перспективные биокатализаторы конверсии олеананового пентациклических тритерпеноидов
*Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б.* ....252

Влияние *Rhizobium leguminosarum* на рост и содержание пролина в трансгенных по гену *psl* и *rapA1* растениях томата
*Масленникова Д.Р., Емелина А.А., Чубукова О.В., Вершинина З.Р.* ....254

Галофильные бактерии, выделенные из солёных озёр Эльтон и Карун, как продуценты внеклеточных протеаз и амилаз
*Матевосян С.Г., Сигида Е.Н., Каневский М.В., Федоненко Ю.П., Коннова С.А.* ....255

Видоспецифичность влияния сортов солода на конечную степень сбраживания при производстве пива
*Милованова А.А.* ....257

Влияние биогенных аминов на рост культуры *Scenedesmus quadricauda*
*Олескин А.В., Постнов А.Л., Цао Боян* ....258

Использование биоэлектрохимических систем в качестве биосенсора для детекции роста концентраций соединений серы и органических субстратов
*Павлова П.А., Панкратова Е.В., Худокормов А.А., Волченко Н.Н., Самков А.А.* ....260

Скрининг ростовых показателей и поверхностно-активных свойств штаммов *Rhodococcus erythropolis* B2 и *Shewanella oneidensis* MR-1, выращенных на различных питательных средах
*Петрова А.П., Волченко Н.Н., Самков А.А., Худокормов А.А.* ....261

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* как перспективный объект биотехнологических производств
*Пирожкова И.С., Пермякова И.А.* ....262

Безмедиаторное окисление глюкозы мембранными фракциями *Gluconobacter oxydans*
*Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетилов А.Н.* ....264

Сравнительная характеристика стероид-трансформирующей активности грибов деструкторов темперной живописи
*Потапов М.П., Кардонский Д.А., Карпова Н.В., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Нураева Г.К., Авданина Д.А., Жгун А.А.* ....265

Оценка фитопатогенности бактерий *Bacillus velezensis*
*Роденко К.А., Басалаева Д.Л., Никельшпарг М.И., Евстигнеева С.С., Глинская Е.В.* ....267

Выделение и характеристика штаммов-продуцентов высокомолекулярных экзополисахаридов
*Сазонова О.И., Ветрова А.А., Соколов С.Л.* ....269

Перспективы трансформации растений биоремедиантов генами грибных лакказ и дальнейшим применением в области биоремедиации почвы
*Саитгареева А.Л., Вершинина З.Р.* ....270

Получение рекомбинантных глюкогидролаз штамма *Streptomyces carpinensis*
*Сафронова М.Ю., Лисов А.В., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.* ....271

Поиск бактериофагов *B. pumilus sensu lato*, обладающих перспективными антибактериальными ферментами
*Скорынина А.В., Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.* ....272

Оптимизация технологии получения препарата бактерий человека для биологической коррекции микрофлоры кишечника
*Сорокина Е.А., Жгун Е.С., Кислун Ю.В., Денисова Е.А.,. Беспятых Ю.А, Ильина Е.Н.* .....275

Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на экспозицию бактерий *Escherichia coli* к ципрофлоксацину
*Сутормина Л.В., Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.* .....276

Генерация электроэнергии при очистке бытовых сточных вод микробным топливным элементом
*Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Решетилов А.Н.* .....279

Родококки как перспективные биодеструкторы фармполлютантов
*Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Полыгалов М.А., Субботина М.В., Тян С.М., Ившина И.Б.* .....280

Биоэлектрокаталитические свойства метилобактерий *M.extorquens* pCM160 в присутствии медиаторов электронного транспорта – феназинметасульфата и 2,6-дихлорфенолиндофенола
*Улитина М.А.* .....282

Холестериноксидаза актинобактерий *Nocardioides simplex*
*Фокина В.В., Брагин Е.Ю., Шутов А.А., Донова М.В.* .....284

Анализ функции гена *kstD2* из *Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д
*Фуфаева С.Р., Довбня Д.В., Ивашина Т.В., Шутов А.А., Донова М.В.* .....286

Ростостимулирующие ризобактерии *Pseudomonas sp.*
*Хакимова Л.Р., Минлишева Г.М., Мурясова А.Р., Вершинина З.Р., Чубукова О.В.* .....288

Сравнительный анализ различных методов выделения геномной ДНК на примере *Bacillus megaterium*
*Чернышов С.А., Цветкова Д.В., Микулинская Г.В.* .....289

Исследование биопленкообразования ризосферных штаммов *Pseudomonas* sp.
*Чубукова О.В., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Симороз Е.В., Чумакова А.К.* .....291

Исследование способности бактерий рода *Rhodococcus* к деколоризации кристаллического фиолетового с оценкой динамики его биокаталитической трансформации
*Чугунова Ю.А., Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А.* .....292

Исследование свойств новой бактериальной пектиново-целлюлозной пленки
*Шарова Т.В., Васильева Т.И., Кленова Н.А.* .....293

Получение красных пигментов бактерий рода *Dietzia* и их частичная характеристика
*Шуненкова Д.И., Егорова А.Д., Понаморева О.Н., Коломыцева М.П.* .....295

Элиситоры MAMP-типа, продуцируемые непатогенными изолятами фузариев, обеспечивают эффективную защиту различных сортов пшеницы и томата от фитопатогенных грибов
*Щербакова Л.А., Джавахия В.Г.* .....296

Антимикробная активность мицелиальных актинобактерий, выделенных из кишечника тропических диплопод
*Якушев А.В., Ефименко Т.А., Карабанова А.А., Демьянкова М.В., Глухова А.А., Грачёва Т.А., Ефременкова О.В.* .....299

Биовыщелачивание никеля из силикатной железо-никелевой руды
*Ячкула А.А.* .....300

# СЕКЦИЯ 1

# МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

## Новый род актинобактерий в семействе *Jiangellaceae*

*Автух А.Н., Дорофеева Л.В., Арискина Е.В., Дущанова К.С., Барышникова Л.М., Евтушенко Л.И.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН; Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН), avtukh@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37876

Штамм ВКМ Ac-2616 выделен из содержимого пищевого кувшина, найденного при археологических раскопках древних курганов Калмыкии. Колонии бесцветные, пастообразные, складчатые или гладкие, формируются на поверхности агаризованной среды и проникают в агар. Штамм образует тонкий (до 3–4 мкм в диаметре) разветвлённый субстратный мицелий, который с возрастом фрагментируется на палочковидные элементы. На некоторых средах может развиваться воздушный мицелий белого цвета, несущий короткие цепочки спор.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК показал, что штамм наиболее близок к организмам семейства *Jiangellaceae* Tang *et al.* 2011 [https://lpsn.dsmz.de/family/jiangellaceae], но хорошо обособляется от них на филогенетической дендрограмме (рис. 1).

Уровень сходства штамма ВКМ Ac-2916 с типовыми видами родов семейства *Jiangellaceae* – *Jiangella gansuensis, Haloactinopolyspora alba* и *Phytoactinopolyspora endophytica* по последовательностям генов 16S рРНК – 96.8, 96.9 и 95.7%, соответственно. Эти цифры согласуются с показателями сходства генов 16S рРНК типовых видов описанных родов *Jiangellaceae* – 96.9% (*J. gansuensis/H. alba*), 96.3% (*J. gansuensis/P. endophytica*), 95.7% (*H. alba/P. endophytica*). Максимальный уровень сходства штамма ВКМ Ac-2900 с ближайшими видами разных родов семейства – 97.5% (*H. alkaliphila*) и 97.4% (*J. aurantiaca*).

Хемотаксономические признаки штамма в целом характерны для представителей семейства *Jiangellaceae.* Клеточная стенка содержит *LL*-диаминопимелиновую кислоту, а также рамнозу и неидентифицированный аминосахар. Доминирующий менахинон дыхательной цепи – МК-9($H_4$), преобладающие жирные кислоты – *anteiso*-$C_{15:0}$ и *iso*-$C_{15:0}$. В составе фосфолипидов обнаружены фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилинозит, а также ацилфосфатидилглицерин, который отсутствует у ближайших видов. Содержание ГЦ-пар в ДНК – 66,9 мол.% [Li *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2020].

Полученные данные позволяют предполагать, что изученный штамм относится к новому роду семейства *Jiangellaceae* порядка *Jiangellales.* Для валидного описания рода требуется секвенирование и анализ полных геномов изученного штамма и других представителей семейства.

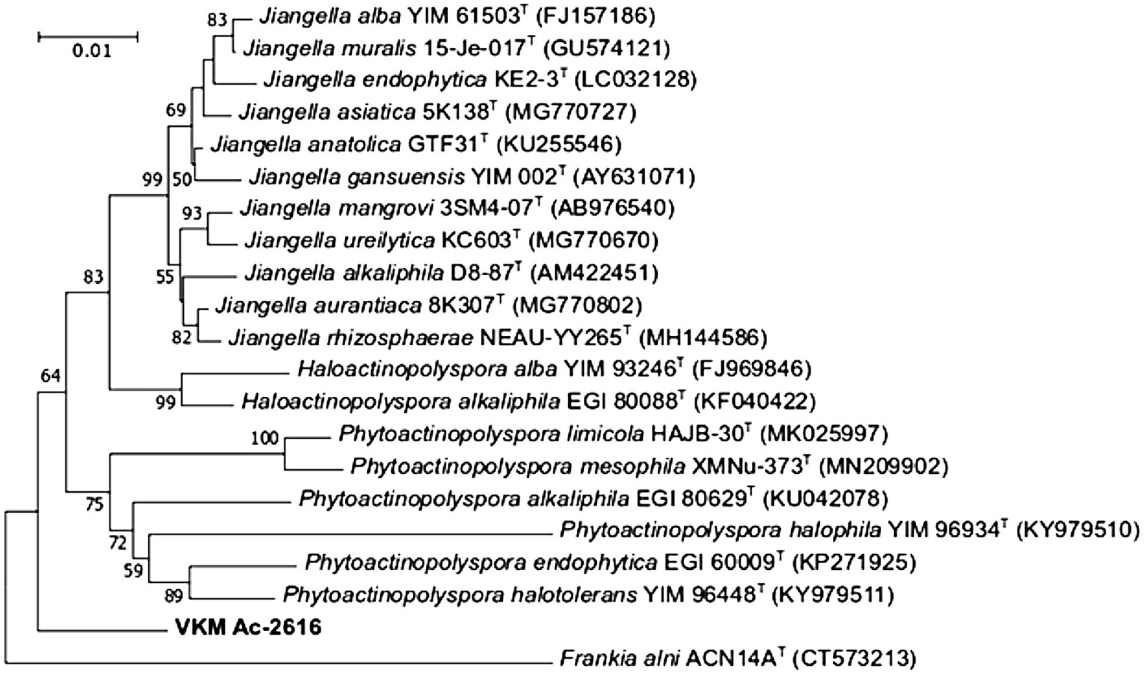



**Рис. 1.** Филогенетическое положение штамма ВКМ Ac-2616 на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК; группировка по методу «neighbour-joining»

## Литература


1. *Tang S.-K., Zhi X.-Y., Wang Y., Shi R., Lou K., Xu L.-H., Li W.-J. 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. 2011. V. 61(1). P. 194–200.
2. *Li L., Ma J.-B., Mohamad O.A., Li S.-H., Osman G., Li Y.-Q., Guo J.-W., Hozzein W.N., Li W.-J. Phytoactinopolyspora endophytica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant filamentous actinomycete isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* F // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65(8). P. 2671–2677.
3. *Feng X.-M., Zhai X.-H., Liu S.-W., Wang C.-M., Sun C.-H., Zhou X., Zhang Y.-J., Li X.-J. Phytoactinopolyspora mesophila* sp. nov., isolated from a saline-alkaline soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70(7). P. 4179–4185.


# Новый вид рода *Methyloligella* и предложение нового семейства *Methyloligellaceae* fam. nov.


*Агафонова Н.В.[1], Груздев Д.С.[2], Капаруллина Е.Н.[1], Доронина Н.В.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), nadyagafonova@gmail.com
[2] SciBear OU



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37877


Недавно из морской среды (вода и донный осадок, побережье о. Лусон, Филиппины) нами выделены новые метилотрофные бактерии, штаммы GL2 и 2.7D. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что данные штаммы являются представителями рода *Methyloligella*. На основании крупного исследования по анализу 1000+ геномов представителей класса *Alphaproteobacteria* (Hördt et al., 2020), бактерии рода *Methyloligella* включены в состав семейства

*Hyphomicrobiaceae* [https://lpsn.dsmz.de/family/hyphomicrobiaceae]. Однако, как новые штаммы, так и известные представители рода *Methyloligella* (*Ml. halotolerans* C2$^T$ и *Ml. solikamskensis* SK12$^T$) заметно отличаются от других представителей семейства *Hyphomicrobiaceae* по морфологическим, физиологическим и экологическим свойствам.

В этой работе мы провели филогенетический и филогеномный анализ новых штаммов и валидно описанных представителей рода *Methyloligella* с целью уточнения их таксономического положения.

Секвенирование генома штамма GL2, филогенетический, филогеномный анализ и определение уровней сходства геномов проводили как описано ранее (Agafonova et al., 2020). Последовательность генома штамма GL2 доступна в NCBI GenBank под номером CP054476.

Показано, что новые изоляты имели 99,9% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между собой и 98,1–98,5% с типовыми представителями рода *Methyloligella*: *Ml. halotolerans* C2$^T$ и *Ml. solikamskensis* SK12$^T$. Данный уровень сходства оказался ниже порогового значения (98,7%), рекомендованного для разделения видов (Chun et al., 2018). Геномный анализ также выявил отличия: значения ANI (80,1%), AAI (73,5%) и dDDH (20,0%) между штаммом GL2 и ближайшим типовым штаммом *Ml. halotolerans* C2$^T$ были ниже порога для разделения видов (ANI < 95%, dDDH < 70%) (Meier-Kolthoff et al., 2013). Следовательно, новые изоляты представляют новый вид рода *Methyloligella*, для которого предложили название *Methyloligella maris* sp. nov.

Кроме того, анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК выявил, что представители рода *Methyloligella* (в т.ч. новые штаммы) имели 95,2–96,2% сходства с представителями рода *Methyloceanibacter* (семейство *Hyphomicrobiaceae*), 94,3–94,6% с "*Methylothermalis aethiopiae*" (порядок *Rhizobiales*), 93,2–93,4% с *Rhodoligotrophos defluvii* (семейство *Parvibaculaceae*) и 92,4–92,9% с представителями семейств *Hyphomicrobiaceae*, *Tepidamorphaceae*, *Afifellaceae* и *Rhodobiaceae*. Полученный разброс подтверждает немонофилетичность семейства *Hyphomicrobiaceae*, которую отмечали ранее Oren и Xu (Oren, Xu, 2014), и ставит под вопрос принадлежность рода *Methyloligella* к этому семейству. В подтверждение нашего предположения, филогеномное дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей 120 консервативных маркерных генов, включающее GL2 и другие доступные геномы *Hyphomicrobiaceae*, четко обозначило независимую кладу, состоящую из родов *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и '*Methylothermalis*' и коррелировало с филогенетическим деревом, построенным на основе последовательностей гена 16S рРНК. Это разделение также поддерживалось пороговыми значениями AAI, предложенными для разделения таксонов (45–65% для одного семейства, 65–95% для одного рода и 95–100% для одного вида) (Konstantinidis et al., 2017): 66,2–74,8% между членами *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и '*Methylothermalis*' и менее 60,8% с другими представителями семейства *Hyphomicrobiaceae*. Также следует отметить значительные морфологические отличия бактерий родов *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и '*Methylothermalis*' (непигментированные, неподвижные палочки, размножающиеся за счет бинарного деления; отсутствие жгутиков, гифов, протек, дихотомически ветвящихся гиф) от таковых у большинства представителей других родов семейства *Hyphomicrobiaceae* (яркая пигментация некоторых представителей, наличие жгутиков, гифов, протек, размножение за счет дихотомически ветвящихся гиф и почкования).

Таким образом, на основании филогенетического и филогеномного анализов мы показали, что штаммы GL2 (= CCUG 75077$^T$ = VKM B-3381$^T$) и 2.7D представляют новый вид рода *Methyloligella* – *Methyloligella maris* sp. nov., и предлагаем отделить новое семейство *Methyloligellaceae* fam. nov. для родов *Methyloligella*, *Methyloceanibacter* и '*Methylothermalis*'.

## Литература


1. *Agafonova N.V., Kaparullina E.N., Grouzdev D.S., Doronina N.V. Hansschlegelia quercus* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium isolated from oak buds. Int J Syst Evol Microbiol, 2020;70:4646-4652.
2. *Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466.
3. *Hördt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M. et al.* Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria*. Front Microbiol 2020;11:468.
4. *Konstantinidis K.T., Roselló-Móra R., Amann R.* Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *ISME J* 2017;11:2399–2406Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Gцker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 2013;14:60.
5. *Oren A., Xu X.* The family *Hyphomicrobiaceae*. The prokaryotes, 2014;247:281.

# Исследование генов резистентности к тетрациклину бактерий промышленных экосистем

*Адельгареева А.Ю., Маркушева Т.В.*

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, tmarkusheva@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37878

Группа тетрациклинов объединяет близкие по своему строению соединения, проявляющих высокую активность в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых простейших.

Большинство генов *tet*, определяющих устойчивость к тетрациклину, кодирует два механизма резистентности, а именно, механизм оттока молекул антибиотика и рибосомной защиты.

Кодируемая геном *tet*M рибосомная защита реализуется через синтез белка, подобного фактору элонгации G, который способен связываться с 30S субъединицей рибосомы, что не дает молекулам тетрациклина ингибировать синтез белков.

Тенденция увеличения пула генов резистентности к тетрациклинам, наблюдаемая в настоящее время в микробных популяциях, обуславливает актуальность изучения резистомов различных экосистем, включая техногенные.

Целью настоящего исследования являлся скрининг кодирующего резистентность к тетрациклину гена *tet*M у бактерий промышленных экотопов.

В качестве объектов работы использовались штаммы, выделенные из образцов почв и грунтов техногенных экосистем, имеющих длительную историю воздействия факторов нефтехимического производства Южного и Северного промузлов Республики Башкортостан.

Исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств культур, в том числе чувствительность к антибиотикам, были проведены ранее [1–5].

Для скрининга генов *tet*M применялся набор Резистом *tet*M (НПФ «Литех», г. Москва). В качестве матрицы использовали лизаты бактериальных клеток.

ПЦР проводили в термоциклере ТС 2720 (Applied biosystems, США) в предложенных производителем условиях. Предварительная денатурация ДНК осуществлялась при 93 °С в течение 30 сек, далее следовало 35 циклов денатурации при 93 °С (10 сек), отжиг при 57 °С (10 сек) и элонгация молекул ДНК при 68 °С (30 сек) с последующей финальной стадией при 68 °С (1 мин). По завершении полимеразной реакции препараты ДНК фракционировали в 1,5%-ном агарозном геле и визуализировали УФ-спектре (280 нм). Заключение о наличии генов *tet*M делали при обнаружении целевого амплификата длиной 407 п.н., устанавливаемого по маркеру длин фрагментов ДНК с диапазоном от 100 п.н. до 1000 п.н.

В результате ПЦР-детекции гена *tet*M у изолятов рода *Bacillus* была обнаружена последовательность, подобная последовательности гена *tet*M.

По данным NCBI присутствие гена *tet*M ранее отмечалось в геномах штаммов, входяших в семейства *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Vibrionaceae.*

Результаты проведенных исследований раскрывают особенности механизмов антибиотикорезистентности бактерий современных антропогенных экосистем и могут быть использованы при разработке подходов их ремедиации.

## Литература

1. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикислот гамма-подкласса протеобактерий // Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г. Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. № 5-2. С. 194–195.
2. Выделение и анализ биодеградационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus* // Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В., Абрамов С.Н. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 5-2. С. 169–171.

3. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маркушева Т.В. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3–4. С. 1320–1322.
4. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Биотехнология. 2003. № 6. С. 67–71.
5. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17S, для очистки промышленных стоков // Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 4. С. 235–240.

# Антимикробная активность водных экстрактов растений вида *Nuphar lutea* (L.) *Smith*, 1809

*Блидина А.И., Зубова К.В., Басалаева Д.Л., Седова О.В.*

ФГБОУВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», ayanarais45@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37879

Являясь наиболее типичным представителем высших водных растений, *Nuphar lutea* (*L.*) *Smith* 1809 (кубышка жёлтая), способна продуцировать метаболиты алкалоидной природы, которые расширяют спектр ее применения. Некоторые выделенные алкалоиды кубышки являются действующими веществами фармакологических препаратов. В настоящее время продолжается активное изучение противоопухолевых и антибактериальных свойств *Nuphar lutea* с целью расширения спектра применения данного лекарственного растения [1–2].

Целью данной работы стало выявление аллелопатических свойств растений вида *Nuphar lutea* по отношению к разным группам микроорганизмов.

Для исследования были отобраны корневища, плавающие листья и цветки *Nuphar lutea* из прудов с разной антропогенной нагрузкой: рекреационная зона г. Саратова и территория Национального парка «Хвалынский» (НПХ). Посевы на микробные ассоциации на средах ГРМ и Сабуро показали сходство видового состава микроорганизмов на органах *Nuphar lutea* из разных прудов. Поверхность органов кубышки желтой, собранной в пруду г. Саратова отличалась значительным бактериальным обсеменением.

Для приготовления водных вытяжек использовали сухое сырье корневищ и плавающих листьев растений *Nuphar lutea*, отобранных в водоемах г. Саратова и НПХ, а также сухое корневище кубышки желтой коммерческого производства г. Уфа. Действие свежих (табл. 1) и прошедших заморозку вытяжек (табл. 2) проверено на культурах бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и грибах *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillum citrinum*, *Cladosporium herbanum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Paelomyces variotii.*

*Таблица 1*

**Противомикробное действие свежих водных вытяжек из разных органов *N. lutea***

| Образцы вытяжек *N. lutea* | Зоны ингибирования клеточных культур, мм | | |
|---|---|---|---|
| | *S. aureus* | *B. cereus* | *E. coli* |
| Корневище г. Саратов | 24±2 | 20±2 | – |
| Корневище НПХ | 25±4 | 19±2 | – |
| Корневище г. Уфа | 30±3 | 15±1 | – |
| Плав. листья г. Саратов | – | – | – |
| Плав. листья НПХ | – | – | – |

*Таблица 2*

**Противомикробное действие водных вытяжек разных частей *N. lutea* после их заморозки**

| Образцы вытяжек *N. lutea* | Зоны ингибирования клеточных культур, мм | | |
|---|---|---|---|
| | *St. aureus* | *B. cereus* | *E. coli* |
| Корневище г. Саратов | – | 15±1 | – |
| Корневище НПХ | – | 13±1 | – |
| Корневище г. Уфа | 8±0,9 | – | – |
| Плав. листья НПХ | – | – | – |

Антимикробное действие водных вытяжек из корневищ *Nuphar lutea* выявлено на культуры грамположительных бактерий: *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*. На грамотрицательную E. coli и грибные культуры ингибирующий эффект обнаружен не был. После заморозки ингибирующее действие водных вытяжек значительно ухудшается или пропадает вовсе. Вытяжки из плавающих листьев *N. lutea* не проявили антимикробного действия ни на одну из исследованных культур. Ранее опубликованные исследования других авторов показывают ингибирование *St. aureus*, *E. coli*, а также грибов *Candida albicans* этанольными экстрактами частей *N. lutea* [3-5].

## Литература


1. Способ получения препарата лютенурина из кубышки желтой (*Nuphar lutea* (L.) Smith): пат. 2016106149 Рос. Федерация. № 2615356; заявл. 25.02.2016; опубл. 04.04.2017 Бюл. № 10.
2. *Марьин А.А.; Коломиец Н.Э.* Лекарственные растения и биологически активные вещества противогрибкового действия // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т. 2, № 4. – С. 45–55.
3. *Федотчева Т.А.* Цитостатическая активность алкалоида кубышки желтой нуфлеина / Т.А. Федотчева, О.П. Шейченко, К.Е. Широких // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 8. – С. 110–115.
4. *Yildirim A.B.; Karakas F.P.; Turker A.U.;* (2013). In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. – 2013. – Vol. 6. – P. 616–624.
5. *Gillitzer P.; Martin C.; Kantar M.; Kauppi K.; Dahlberg S.; Lis D.; Kurle J.; Sheaffer C.; Wyse D.* Optimization of screening of native and naturalized plants from Minnesota for antimicrobial activity // J. Med. Plants Res. – 2012. – Vol. 6. – P. 938–949.


# Никелевая пена как новый материал подложки амперометрических бактериальных биосенсоров


*Быков А.Г., Решетилов А.Н.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), agbykov@rambler.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37880


Бактериальные биосенсоры являются высокоселективными, чувствительными, обладающими широкой субстратной специфичностью, достаточно низкой себестоимостью в изготовлении аналитическими устройствами для детекции различных веществ.

Для иммобилизации биомассы нами использован новый, малоизвестный материал – никелевая пена. В последнее время появилось несколько публикаций о его применении в конструировании химических батарей и конденсаторов. Данный материал представляет большой интерес как основа для формирования скрин-принт электродов биосенсоров, а также электродов для электрохимической импедансной

спектроскопии и биотопливных элементов. Электрод из никелевой пены имеет большую внутреннюю поверхность и может обеспечить высокую эффективность биотопливных элементов. Однако поведение бактериальных клеток на никелевом электроде не исследовалось. Поэтому представляет интерес оценить влияние подложки из никелевой пены на дыхательную активность клеток бактерий с помощью кислородного электрода типа Кларка.

Используемые в эксперименте бактерии штамма *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ФГБУН ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН) обладают уникальной организацией метаболической системы, характеризующейся поверхностной локализацией ряда основных окислительных ферментов и высокой оперативностью электрон-транспортной цепи, что обеспечивает быстрый ответ биосенсора [1]. Представители рода *Gluconobacter* широко используются в биотехнологии для процессов производства аскорбиновой, уксусной и других кислот, могут являться эффективными биокатализаторами в составе биосенсора [2].

Целью работы являлось исследование перспектив дальнейшего применения никелевой пены как основы для амперометрических бактериальных биосенсоров и биотопливных элементов, с помощью биосенсора на основе кислородного электрода типа Кларка.

## Материалы и методы

***Культивирование микроорганизмов.*** В работе использовали бактерии *G. oxydans* ВКМ В-1280. Культивирование бактерий проводили на питательной среде состава: 200 г/л D-сорбит (ООО Диаэм); 20 г/л дрожжевой экстракт (ООО Диаэм); дистиллированная вода – 100 мл, pH среды – 5.2–5.5, при температуре 28 °С в течение 20 часов. Клетки собирали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин и отмывали двукратно 25 мМ калий фосфатным буфером с pH 6.5. Полученную биомассу замораживали при -10 °С.

***Иммобилизация биомассы на подложке.*** Биомассу клеток микроорганизмов взвешивали и ресуспендировали в калий фосфатном буферном растворе (25 мМ, pH 6.5) до конечной концентрации 200 мг/мл по сырой массе бактерий. Далее на пористую подложку для высыхания наносился 1 мг биомассы. Для модификации рецептора использовался проводящий полимер поли(3,4-этилендиокситиофен):поли (стиролсульфонат) (PEDOT:PSS) в соотношении 1 к 1 с количеством биомассы. Подготовленный таким образом рецепторный элемент размещали на поверхности кислородного электрода типа Кларка (ООО Эконикс-Эксперт) и фиксировали с помощью нейлоновой сетки.

Измерения проводили в кювете объемом 2 мл в калий фосфатном буферном растворе (25 мМ, pH 6.5) при постоянном перемешивании (200 об/мин), при температуре 20 °С. В измерительную кювету с биосенсором вводился раствор глюкозы в концентрации 25 мМ (итоговая концентрация в кювете 1.25 мМ. Измеряемым параметром являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (нА/с).

В таблице представлены средние значения ответов для биосенсоров с подложкой на основе никелевой пены в сравнении с их аналогом на основе хроматографической бумаги (Whatman GF/A, Sigma), а также для их модификаций проводящим полимером PEDOT:PSS.

*Таблица*

**Средние значения ответов биосенсоров но основе кислородного электрода типа Кларка для разных вариантов подложек рецепторного элемента**

| Материал подложки | Рецепторный элемент | Покрытие рецептора | Показания биосенсора, a±s, (нА/с) |
|---|---|---|---|
| Никелевая пена | Клетки | – | 0.28±0.14 |
| Никелевая пена | Клетки | PEDOT:PSS | 0.09±0.06 |
| Никелевая пена | Клетки+ PEDOT:PSS | – | 0.005±0.002 |
| GF/A | Клетки | – | 0.46±0.079 |
| GF/A | Клетки | PEDOT:PSS | 0.26±0.006 |
| GF/A | Клетки+ PEDOT:PSS | – | 0.21±0.05 |

*Примечание*: a – средний результат (n = 10), s – стандартное отклонение.

## Выводы

В сравнении с хроматографической бумагой как материала подложки для амперометрических бактериальных биосенсоров, использование никелевой пены без модификации его полимером показало снижение сигнала в 1.6 раза. Это может говорить о меньшем количестве биомассы, иммобилизованной на никелевую подложку. Модификация подложки PEDOT:PSS привела к снижению сигнала биосенсора в 2.8 раза, а модификация биомассы PEDOT:PSS в 42 раза. Полученные результаты нельзя классифицировать как сугубо негативные; для дальнейшего ответа на вопрос о целесообразности применения никелевой пены в амперометрических электродах требуется оценить поведение бактериальных клеток на электродах с прямым переносом заряда.

## Литература


1. *Prust C., Hoffmeister M., Liesegang H. et al.* Complete genome sequence of the acetic acid bacterium Gluconobacter oxydans // Nature biotechnology. 2005. V. 23. № 2. P. 195–200.
2. *Tkac J., Svitel J., Vostiar I., Navratil M. et al.* Membrane-bound dehydrogenases from Gluconobacter sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. // Bioelectrochemistry. 2009. V. 76. Issues 1–2. P. 53-62.


# Сорбционная биоремедиация нефтезагрязненных почв в разных почвенно-климатических условиях Российской Федерации


*Васильева Г.К.[1], Михедова Е.Е.[1], Стрижакова Е.Р.[1], Филонов А.Е.[2], Ахметов Л.[2]*

[1] «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН), gkvasilyeva@rambler.ru
[2] (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37881


На сегодняшний день Российская Федерация является одной из богатейших стран мира по запасам нефти и газа. Согласно данным Министерства энергетики, только в 2019 году в России произошло 17 тыс. аварийных нефтеразливов. Существенный вклад в загрязнение почв углеводородами нефти вносит автотранспорт, особенно в густонаселенных районах центральной полосы России, а в Арктическом регионе повышается риск разливов в местах хранения жидкого топлива из-за таяния вечной мерзлоты. Поэтому проблема разработки эффективных и экономичных методов очистки территорий от углеводородов нефти в различных регионах РФ является весьма актуальной.

Одним из наиболее перспективных методов очистки химически загрязненных почв является метод биоремедиации, основанный на использовании потенциала микроорганизмов разлагать и утилизировать различные органические соединения. На базе ИБФМ РАН выделены штаммы микроорганизмов-деструкторов, разработан целый ряд биопрепаратов, предназначенных для использования при биоремедиации нефтезагрязненных почв. Однако на сегодняшний день метод биоремедиации используется недостаточно широко: в РФ в 10–15%, а в США – в 30% случаев очистки нефтезагрязненных почв. Около 30 лет в ИФХиБПП РАН проводятся исследования по разработке метода сорбционной биоремедиации, основанного на использовании различных сорбентов, позволяющих существенно расширить возможности проведения биологической очистки почв, загрязненных высокими дозами различных поллютантов органической природы [1].

Начиная с 2007 г., на базе лаборатории физико-химии почв ИФХиБПП РАН совместно с лабораторией генетики микроорганизмов ИБФМ РАН проводятся исследования по разработке метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных почв для разных почвенно-климатических условий. Доказана эффективность применения сорбционной биоремедиации для почв центрального региона России: серой лесной (СЛ), черноземной и аллювиально-луговой. Установлено, что для создания оптимальных условий для активации микроорганизмов-нефтедеструкторов необходимо поддержание наилучшего аэрогидротермического режима, а также внесение оптимальных доз минеральных удобрений и извес-

ти, которые поддерживают необходимый уровень биофильных элементов (NPK) и одновременно оптимальный кислотно-солевой режим.

Важнейшим фактором, влияющим на эффективность протекания процесса, является также отсутствие токсического действия среды на микроорганизмы. На первом этапе биоремедиации токсическое действие на микроорганизмы-деструкторы оказывает присутствие гидрофобных компонентов нефти, которые нарушают проницаемость клеточных мембран микроорганизмов, а также снижают доступность воды и биофильных элементов почвы. Другой причиной повышенной токсичности нефтезагрязненных почв является накопление промежуточных продуктов окисления углеводородов (спирты, альдегиды, кислоты), обладающих более высокой по сравнению с исходными углеводородами токсичностью и подвижностью. Накопление повышенных концентраций этих токсикантов является основной причиной низкой эффективности использования биопрепаратов при биоремедиации сильно загрязненных почв. Помимо этого, накопление таких компонентов в почве повышает риск загрязнения грунтовых и поверхностных вод токсичными веществами при проведении процесса очистки в условиях *in situ*.

На примере загрязненной нефтью СЛ почвы показано, что внесение биопрепарата «Микробак» было эффективно лишь при умеренной дозе нефтяного загрязнения (10% нефти), тогда как при высоком уровне загрязнения (15% нефти) положительное воздействие вносимого препарата наблюдалось лишь при его внесении на фоне оптимальной дозы активированного угля. При этом резко снижается вымывание токсичных соединений с промывными водами [2]. Внесение оптимальных доз натуральных сорбентов трех классов (минеральные, органические и углеродистые) также положительно влияло на скорость разложения углеводородов в СЛ почве, особенно в первые два сезона обработки. Доказано, что положительное действие сорбентов объясняется снижением токсичности загрязненных почв за счет преимущественно обратимой сорбции поллютантов [3]. При этом лишь в присутствии ряда сорбентов происходит незначительное замедление разложения фракции полициклических ароматических углеводородов вследствие их более прочной сорбции в нанопоровом пространстве сорбентов. Тем не менее, не наблюдалось накопления этих компонентов нефти в надземной части высеянных растений-фиторемедиаторов. Другим положительным фактором действия сорбентов является снижение гидрофобности нефтезагрязненных почв, что приводит к повышению их влагоемкости, а, следовательно, обеспечивает более высокий уровень влажности почвы, тогда как в загрязненных образцах без сорбентов наблюдалось сильное пересыхание почвы.

В последние 2 года была поставлена задача разработать технологию сорбционной биоремедиации песчаных почв Северной части нефтедобывающего района западной Сибири. Минеральные почвы этого региона отличаются легким гранулометрическим составом, низким уровнем органического вещества ($C_{орг}$ 0,1–0,9%), кислым $pH_в$ (5,4–5,9) и очень низким уровнем обеспеченности биофильными элементами (1–3 мг $P_2O_5$/100 г и 2–9 мг $K_2O$/100 г). На первом этапе в условиях вегетационного эксперимента с глеево-подзолистой почвой, отобранной вблизи Ново-Уренгойского НГКМ, были найдены оптимальные формы и дозы сорбентов. На следующем этапе проводили микрополевой эксперимент с подбуром грубогумусированным, отобранным вблизи Самотлорского месторождения, и двумя оптимальными дозами сорбентов. Наибольший эффект оказывал композитный сорбент на основе активированного угля и торфа при биоремедиации почвы, загрязненной 12% нефти. Механизм действия сорбентов объясняется снижением токсичности и гидрофобности почвы, и одновременно повышением ее влагоемкости. Повышенная активность микроорганизмов-деструкторов в почве в присутствии сорбента подтверждается более быстрым и полным разложением УВН, меньшим накоплением окисленных производных, более высоким уровнем дегидрогеназной активности почвы и численности нефтедеструкторов по сравнению с контролем. В отличие от варианта с сорбентом, где наблюдался активный рост посеянных трав, в контроле растения погибали.

В 2021 г. был заложен полевой эксперимент на территории экспериментальной площадки ЛПДС «Западный Сургут» АО «ТРАНСНЕФТЬ-СИБИРЬ», где в качестве исходной почвы использовался литострат песчаный, которым отсыпана территория этой станции и ее окрестности. Уже в течение первого сезона на опытном участке, загрязненном 15% нефти, с добавками 10 и особенно 20% сорбента и биопрепарата «Оксидойл» наблюдалось более быстрое разложение УВН, а к концу сезона в них наблюдался заметный рост трав, тогда как в контроле с одним биопрепаратом растения полностью погибали.

Доказана более высокая экономическая эффективность метода сорбционной биоремедиации почв, сильно загрязненных нефтью, по сравнению с механическим методом удаления нефтеразливов с помощью экскавирования и утилизации на полигонах [4].

## Литература

1. *Васильева Г.К. и др.* Глава в кн.: Эволюция, функционирование и экологическая роль почв как компонента биосферы / Пущино: KMK SP Limited, 2020, – 290 с., с. 111–124.
2. *Vasilyeva G.K. et al.* Science of the Total Environment, 2020, v. 706, № 135739.
3. *Зиннатшина Л.В. и др.* Естественные и технические науки, 2018, 9:24-30.
4. *Слюсаревский А.В. и др.* Экология и промышленность России, 2018, 22(11):40-45.


# Микробное разнообразие филлопланы и концентрация тяжелых металлов в окружающей среде: влияние расстояния от дороги с интенсивным движением


*Ветрова А.[1], Сазонова О.[1], Иващенко К.[1,2], Корнейкова М.[2,3], Ермакова А.[2], Константинов П.[5], Сотникова Ю.[2], Сошина А.[3], Васильева М.[2], Васенев В.[2,5], Гавричкова О[6].*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
[2] Российский университет дружбы народов
[3] Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН
[4] Московский государственный университет
[5] Группа географии почв и ландшафтов, Вагенингенский университет, Вагенинген, Нидерланды
[6] Научно-исследовательский институт наземных экосистем, Национальный исследовательский совет, Порано, Италия



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37882


В условиях увеличения масштабов и скорости урбанизации загрязнение воздуха в городских районах является глобальной проблемой из-за его негативного воздействия на здоровье человека и функционирование экосистем. Все больший интерес вызывает роль растительности в городских районах, поскольку известно, что зеленые насаждения способны снижать концентрацию загрязняющих веществ в окружающей среде за счет осаждения пыли на поверхности листьев. Микробное сообщество листовых поверхностей, филлопланы, не является случайным скоплением микроорганизмов. Филлоплана находятся под постоянным воздействием различных факторов, включая загрязнение воздуха и почв, что приводит к изменению структуры ее микробного сообщества. Такие изменения могут иметь как временную, так и пространственную динамику. Одним из общепринятых подходов для оценки воздействия загрязняющих веществ на различные биологические объекты являются исследования по градиенту концентрации, где различные концентрации загрязняющих веществ достигается за счет варьирования расстояния от источника загрязнения. Целью данной работы было исследование таксономического разнообразия микроорганизмов, бактерий и грибов, филлопланы *Betula pendula*, выделенной с деревьев, растущих на разном расстоянии от дороги с интенсивным движением.

Образцы листовых пластинок были отобраны в августе 2020 года в г. Москва вдоль трех трансект, установленных, начиная от дороги с интенсивным движением транспорта (Ленинский проспект). Каждая трансекта состояла из 4-х точек: 2 м, 10 м, 30 м и 50 м от дороги. Для изучения микробного сообщества филлопланы проводили смыв микроорганизмов с поверхности листовых пластинок (общая площадь каждого образца составляла около 1000 см$^2$). Выделение общей геномной ДНК проводили с использованием DNeasyPowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Германия). ПЦР-амплификация, подготовка библиотек для NGS-секвенирования и последующее секвенирование V3-V4 региона гена 16S рРНК и ITS1 области были проведены компанией Sequentia Biotech SL (Барселона, Испания) на платформе Illumina MiSeq. Оценку концентрации потенциально опасных тяжелых металлов на листовых пластинках проводили при помощи ICP-OES Avio2000 (Perkin Elmer, США) и использвали как индикатор качества воздуха для каждого конкретоного расстояния от дороги.

Химический анализ пыли показал, что концентрации таких поллютантов как Cu, Zn, Pb, Fe, Na и Ca были выше на листьях придорожных деревьев (2 м). Концентрации Mn и K увеличивались с удалением

от дороги, в то время как концентрация цинка уменьшалась в 2 раза вдоль трансект (от дороги до лесных участков). Для других элементов (Al, Si) четкой динамики концентрации в зависимости от расстояния от источника загрязнения не наблюдалось.

По результатам секвенирования, всего было обнаружено 15 филумов бактерий. Наиболее представленным был филум *Proteobacteria* (от 42,5 до 48,3%), за ним следовали *Bacteroidetes* (от 12,4 до 18,5%), *Actinobacteria* (от 1,7 до 4,8%) и *Cyanobacteria* (от 1,1 до 2,3%). На *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* в совокупности приходилось более 60% всех считываний, независимо от образца. В пределах протеобактерий большинство филотипов были отнесены к классу *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Хотя распределение этих классов протеобактерий было равномерным в образцах, взятых на расстоянии 2 и 10 метров от дороги, альфапротеобактерии и гаммапротеобактерии преобладали в образцах, взятых на расстоянии 30 и 50 метров. *Bacteroidetes*, второй основной филум, был распределен по следующим классам *Cytophagia*, *Sphingobacteriia*, *Flavobacteriia* и *Chitinophagia*. Содержание *Flavobacteriia* и *Chitinophagia* было низким во всех образцах.

Для сообщества микроскопических грибов было идентифицировано 3 филума, из которых на *Ascomycota* и *Basidiomycota* в совокупности приходилось более 88% всех прочтений. Было обнаружено 13 классов грибов с относительным обилием выше 0,1%, причем *Exobasidiomycetes* и *Dothideomycetes* в общей сложности составляли 49% прочтений (диапазон от 44 до 54%) с относительным обилием выше 10%.

Альфа-разнообразие бактериальных и грибковых сообществ было изучено с использованием индексов Шеннона и Chao1. Минимальный индекс α-разнообразия был получен для образцов, собранных с расстояния 10 м от дороги. Для грибных сообществ наблюдалось снижение индекса Chao1 и увеличение индекса Шеннона в зависимости от удаления расстояния от дороги. Бета-разнообразие бактериальных и грибковых сообществ оценивали с помощью коэффициента Брэя Кертиса. Структура бактериальных сообществ была наиболее схожей в образцах пыли с листовых пластин на расстояниях 30 м и 50 м. Структура грибных сообществ была наиболее схожей в образцах пыли с листовых пластинок на расстояниях 10 м и 50 м.

Нами не было обнаружено, что расстояние от источника загрязнения и варьирование концентраций тяжелых металлов на поверхности листьев существенно влияет на состав прокариотического сообщества. Изменения касались в основном увеличения числа бактерий рода *Pseudomonas* и присутствии *Gemmatimonadetes* в образце, отобранном на расстоянии 2 м от дороги. Для грибного сообщества градиент наблюдался на уровне двух классов грибов *Sordariomycetes* и *Agaricostilbomycetes*. По результатам данного исследования можно предположить, что филлоплана обладает значительными буферными свойствами в отношении собственного микробного сообщества, позволяющими поддерживать консервативность его таксономического состава.

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

## Молекулярно-генетический анализ микробных сообществ подземных вод города Москвы, подверженных антропогенному воздействию

*Груздев Е.В., Кадников В.В., Белецкий А.В., Бегматов Ш.А., Марданов А.В., Равин Н.В.*

Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, gruevg@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37883

Мегаполис – это сложная экосистема с одной из самых высоких антропогенных нагрузок. Важным компонентом экосистемы мегаполиса являются грунтовые воды, из которых формируются родники, непосредственно связанные с водно-болотными угодьями и множеством поверхностных водоемов, играющих важную роль в биоразнообразии мегаполиса и прилегающих территории. Ухудшение качества грунтовых вод под действием антропогенных факторов – одна из глобальных проблем.

Грунтовые воды являются средой обитания для разнообразных микробных сообществ, участвующих в биогеохимических процессах, в том числе процессах биоразложения антропогенных загрязнителей. Основными загрязнителями грунтовых вод в условиях мегаполиса являются бытовые и промышленные отходы, тяжелые металлы, нефтепродукты и моющие средства, в том числе различные растворители. Загрязнение грунтовых вод ведет к изменению их характеристик, что в свою очередь влияет на разнообразие и состав микробных сообществ (Sonthiphand et al., 2019).

В данной работе изучены пять естественных родников Москвы, пробы воды из которых были отобраны в весенний период 2021 г., после схода снега. Два родника расположены в Битцевском лесу, первый в районе Ясенево, второй – «Серебряные ключи» возле впадения Коньковского ручья в реку Чертановку. Третий родник – «Кадочка» в Коломенском парке. Четвертый находится на территории природного заказника «Воробьевы горы», ниже улицы Косыгина, а пятый – на территории парка «Крылатские холмы».

Для каждой пробы воды были определены физико-химические параметры (pH, температура, окислительно-восстановительный потенциал, элементный и ионный состав) и проведен анализ состава микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования ПЦР фрагментов генов 16S рРНК.

В результате анализа суммарно в пяти сообществах определено 1071 оперативных таксономических единиц (ОТЕ) уровня вида (97% идентичность последовательностей), представляющих археи, и 10191 ОТЕ бактерий, всего 87 филумов (рис. 1). В пробах «Ясенево», «Коломенское» и «Косыгина» наиболее многочисленным филумом является *Proteobacteria*, в образце «Битца» – *Patescibacteria*.

Наиболее близкими между собой по биоразнообразию и представленным группам прокариот являются образцы «Ясенево» и «Коломенское». В данных образцах значительная доля обнаруженных *Proteobacteria* представлена галофильными бактериями рода *Halomonas.* Другой интересный компонент *Proteobacteria,* широко представленный в пробе «Ясенево», – бактерии родов *Alcanivorax* и *Thalassospira*, культивируемые представители которых могут принимать участие в разложении углеводородов нефтяного происхождения (Bôto et al., 2021). В то время в пробе «Коломенское» широко представлены метан-окисляющие бактерии семейства *Methylomonadaceae*. В сообществе родника «Косыгина» среди *Proteobacteria* обнаружены железоокисляющие бактерии семейства *Gallionellaceae*, в том числе *Gallionella* и *Sideroxydans*

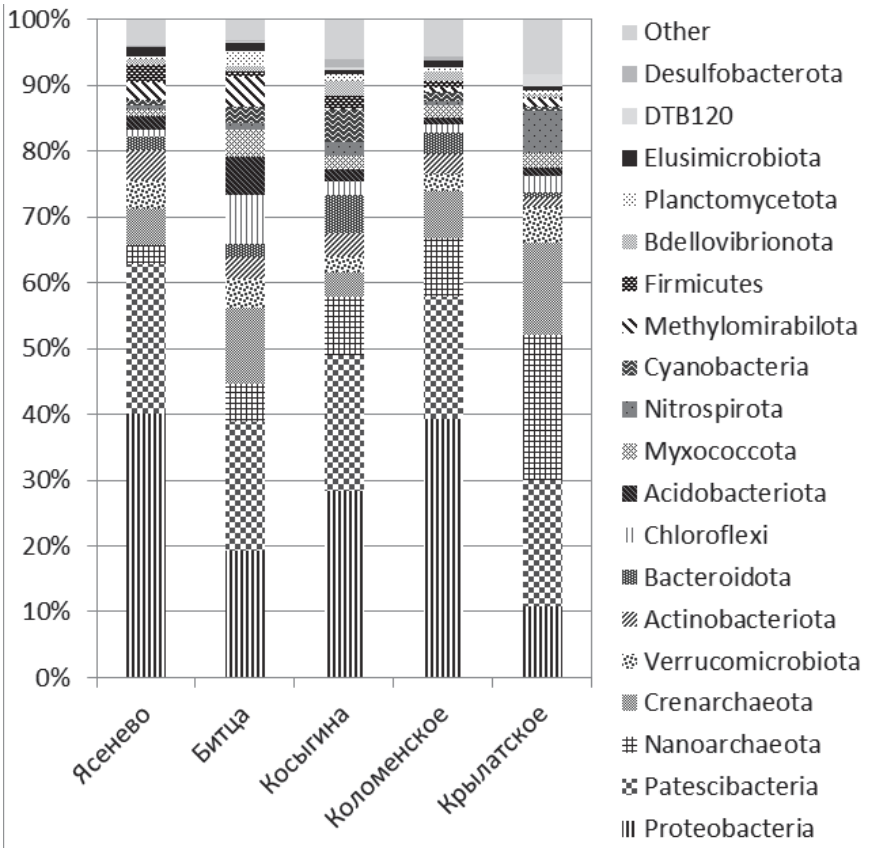



**Рис. 1.** Таксономический состав микробных сообществ подземных вод города Москвы

(Toplak et al., 2021). Бактерии филума *Patescibacteria* во всех сообществах оставляют около 20% и были представлены 3409 ОТЕ.

Обнаруженные сообществах археи в большинстве принадлежат к *Nanoarchaeia* порядка *Woesearchaeales* и аммоний-окисляющим *Crenarchaeota* семейств *Nitrosopumilaceae* и *Nitrosotaleaceae* (Toumi et al., 2021). Единственным образцом, где доминирующий филум представлял археи (*Nanoarchaeota*), является проба из родника в Крылатских холмах, где суммарная доля архей составляет 38,36%.

Общей чертой всех рассмотренных микробных сообществ является присутствие галофильных бактерий, устойчивых к высоким концентрациям солей. Однако химический анализ не показал значительного превышения концентрации солей в исследуемых образцах воды. Поэтому можно предположить, что повышение концентрации солей в исследуемых грунтовых водах может иметь периодический характер.

Присутствие микроорганизмов, потенциально участвующих в процессах разложения нефтепродуктов, может свидетельствовать о протекании естественных процессов биоремедиации в почвах и грунтовых водах.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-34-70027.*

## Литература

1. *Bôto M. L. et al.* Harnessing the potential of native microbial communities for bioremediation of oil spills in the Iberian Peninsula NW coast // Frontiers in microbiology. – 2021. – Т. 12. – С. 879.
2. *Sonthiphand P. et al.* Metagenomic insights into microbial diversity in a groundwater basin impacted by a variety of anthropogenic activities // Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – Т. 26. – № 26. – С. 26765–26781.
3. *Toplak N. et al.* Diversity of Bacterial Populations with Iron Oxide/Hydroxide Formations in the Abandoned Sitarjevec Mine (Slovenia) // Geomicrobiology Journal. – 2021. – Т. 38. – №. 2. – С. 164–173.
4. *Toumi M. et al.* Cultivation and Molecular Studies to Reveal the Microbial Communities of Groundwater Discharge Located in Hungary // Water. – 2021. – Т. 13. – № 11. – С. 1533

# Ростостимулирующий эффект суспензии микроводоросли Chlorella vulgaris при выращивании томата в условиях закрытого грунта

*Доренская А.Ю.*

ФГБОУ ВО «Курский государственный университет», г. Курск, dorenskaya.00@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37884

Хлорелла – это эффективный органический естественный биостимулятор растений, ускоряющий корнеобразование, рост и развитие [3]. Улучшает их внешний вид, сокращает время и затраты на уход за растениями. Микроводоросли повышают урожайность сельскохозяйственных культур, обогащая почву органическими веществами, улучшая ее структуру, стимулируя рост полезных почвенных микроорганизмов (Голлербах М.М., Штина Э.А., 1969). Кроме того, они являются источником физиологически активных веществ, играющих особую роль в почвенных процессах (Музафаров А.М. и др., 1977).

Суспензия Chlorella vulgaris повышает подвижность микроэлементов и содержание свободных аминокислот, улучшает ферментативную активность почвы и коэффициент использования азотных удобрений, утилизирует пестициды, снижает заболеваемость растений. Стимуляторы роста на основе хлореллы могут отлично заменять химические удобрения [3].

Цель настоящего исследования – оценка эффективности влияния суспензии микроводоросли Chlorella vulgaris на всхожесть семян, рост и развитие растений Lycopersicum De Barao chernui в условиях вегетационного опыта.

Экспериментальные исследования проводилось в лаборатории физиологии и биологии растений Курского государственного университета. Для определения ростостимулирующей активности суспен-

зии хлореллы использовали сорт томата Томат Де Барао Чёрный. Это среднепоздний сорт сливовидной формы и темно-бордового цвета.

Обработка объекта микроводорослью включала несколько этапов: опрыскивание почвы, замачивание семян, полив и опрыскивание растений [5]. Для обработки почвы и полива 20 мл суспензии хлореллы разводили в 1 л воды [4]. Для замачивания семян разводили раствор хлореллы водой из расчёта 1 часть хлореллы к 4 частям воды, замачивали на 7 часов. Спустя 7 часов после замачивания семена высевали в обработанную почву. Опыт проводили в лабораторных условиях в течение 30 суток [2].

Начальные этапы исследований характеризовались определенной синхронностью в появлении всходов и не имели статистически значимых различий в энергии прорастания и лабораторной всхожести семян в опытных и контрольных вариантах.

Стимулирующий эффект микроводоросли наиболее ярко отразился на морфометрических и физиологических показателях растений (рис. 1).

Высота растений в опытном варианте на 25,4% превосходила контрольные. Это явление объясняется тем, что хлорелла содержит природные гиббереллины и ауксины, которые являются регуляторами роста и развития растений. Они оказывают позитивное влияние на гормональную систему растений, а также способствуют активации наиболее полного процесса клеточного деления.

Являясь абсолютно натуральным органическим биостимулятором роста растений, суспензия микроводоросли ускорила процессы ризогенеза: общая длина корней опытных растений в 1,4 раза больше контрольных образцов. Усиленное корнеобразование способствует росту и развитию растения, накоплению сырой и сухой массы, которая на 30,7% и 33,9% соответственно была выше у растений, выращенных в условиях микроводоросли. Стимулирующий эффект суспензии объясняется и способностью накапливать в себе все необходимые вещества для роста и развития клеток в естественной природной легкоусвояемой форме и высокой концентрации. Это свойство позволяет увеличивать плодородие почвы, способствует размножению полезных почвообразующих микроорганизмов.

При использовании суспензии водоросли Chlorella vulgaris интенсивность фотосинтеза опытного варианта возрастает на 0,0086 мг/см$^2$ час. Исследования накопления сухой массы подтверждают это, так как растения, выращенные в условиях микроводоросли, превосходили массу контрольного варианта. Увеличение фотосинтетический деятельности при использовании суспензии водоросли Chlorella vulgaris объясняет ускорения процесса ризогенеза и обеспечивает интенсивное поступление минеральных элементов.

Таким образом, экспериментальная оценка влияния суспензии водоросли Chlorella vulgaris показала, что данные автотрофные микроорганизмы вызывают статистически значимое увеличение морфофизи-

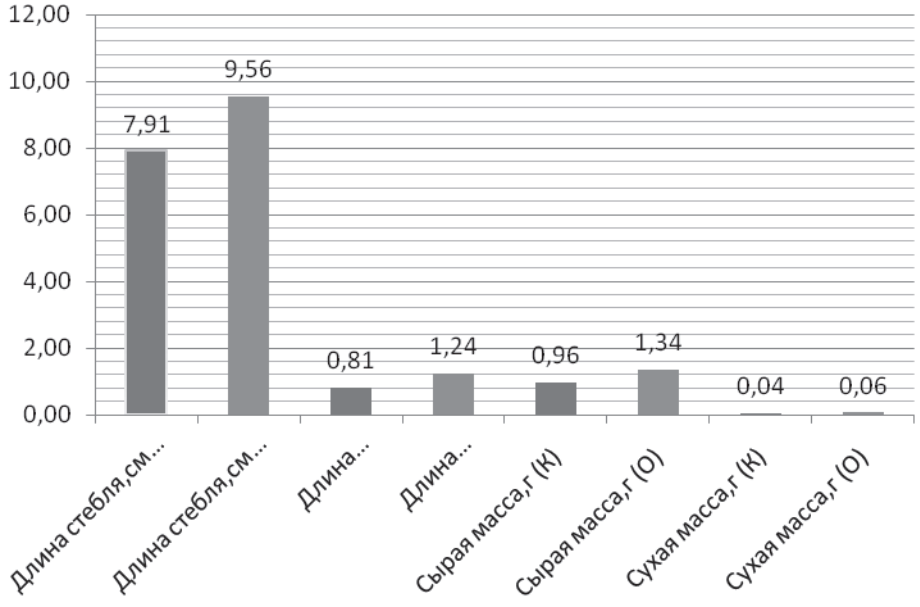



**Рис. 1.** Влияние суспензии микроводорослей на ростовые качества растений томата в условиях закрытого грунта

ологических показателей Lycopersicum De Barao chernui. Суспензия микроводоросли оказывает явный росторегулирующий эффект, что позволяет использовать этот препарат в качестве экологически безопасного стимулятора роста.

### Литература


1. *Бачура Ю.М., Матвеенкова Т.Д.* Влияние культуральной жидкости микроводорослей на рост и развитие семян редиса // Бюллетень науки и практики 2018 Т. 4, № 11. С. 220–227.
2. *Богданов Н.И.* «Суспензия хлореллы сельскохозяйственных животных. Волгоград, 2007.
3. *Иванов Г.Ю.* «Установка для культивирования хлореллы» , 2011.
4. *Плутахин Г.А., Мачнева Н.Л., Трохимчук Н.Н.* Интенсификация культивирования хлореллы с использованием наночастиц железа // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017.
5. *Сальникова М.Я.* «Хлорелла – новый вид корма». М.: Колос, 1977.


## Влияние 3D-нанокомпозитов $Al_2O_3/TiO_2$ на фитопатогенные микроорганизмы *Pseudomonas sp.*


*Дорошенко А.А., Тучина Е.С.*

Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, lelka.doroshenko@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37885


Необходимость преодоления недостатков в традиционных противомикробных стратегиях стимулировала изучение альтернативных подходов, таких как ФДТ, для борьбы с патогенными микроорганизмами как в клинической, так и в сельскохозяйственной областях (de Menezes, H.D. at al., 2014).

ФДТ – трехкомпонентный метод антимикробного воздействия. Два компонента – фотосенсибилизатор и свет, являются нетоксичными, экзогенными факторами. Третьим обязательным компонентом фотодинамической реакции является эндогенный фактор – кислород.

Суть метода состоит в том, что многие биологические объекты (раковые клетки, воспаленные ткани, микробы и вирусы) могут накапливать определенные красители – ФС, обладающие повышенной чувствительностью к возбуждающему действию света соответствующей длины волны. Под действием энергии светового излучения в клетках, захвативших краситель, развивается фотохимическая реакция с выделением синглетного кислорода и свободных радикалов (Castano et al., 2004).

Многочисленные исследования показали, что широкое разнообразие патогенных бактерий и грибов чувствительны к ФДИ.

Структуры клеточной стенки являются основной мишенью препаратов ФДИ, в то время как повреждение ДНК играет только вспомогательную роль, и по этой причине не обязательно, чтобы препараты проникли в клетку (Hamblin at al., 2004).

На данный момент очень большое внимание уделяют влиянию ФДИ на патогенные микроорганизмы человека, но при этом ведётся крайне мало подобных исследований с фитопатогенами. Имеются данные о воздействии ФДИ на *Pseudomonas syringae pv. actinidiae* (Psa) – фитопатоген и возбудитель бактериального рака киви. Результаты показывают, что ФДТ, опосредованная катионными порфиринами, была способна успешно инактивировать Psa как в условиях in vitro, так и ex vivo (на листьях киви) (L. Margarida at al., 2020). Так же проводились исследования с использованием биопленок *Pseudomonas fluorescens,* которое показало, что данные микроорганизмы чувствительны к фиолетовому (400 нм) и синему (420 нм) свету, который приводит к их инактивации (Angarano V. at al., 2020).

Целью данной работы являлось определение чувствительности фитопатогенных микроорганизмов к композитным наноструктурам на основе $Al_2O_3$ без доступа света.

В качестве материала для выделения фитопатогенных микроорганизмов использовали плоды томатов и яблоки. Высев из разведенного 1:$10^3$ субстрата проводили на селективные среды, такие как МТ И КВС (Каталог штаммов, 2009, Сиволодский Е.П., 2012). В результате было выделено 11 штаммов, относящихся к родам Pseudomonas и Xanthomonas.

Для дальнейшей работы использовали 24-часовые взвеси штамма *Pseudomonas sp. 13.1*, характеризующийся наиболее сильной продукцией флюоресцирующего пигмента в среду культивирования. 3D композитные наноструктуры на основе $Al_2O_3$ были произведены в НИИ им. А.И. Фрумкина по оригинальной технологии и представляли собой сетку из нанофибрилл, и демонстрировали высокую антибактериальную фотокаталитическую активность в предыдущих исследованиях (Светлакова А.В и др., 2021). Бактериальную суспензию микроорганизмов объемом 1 мл добавляли в лунки полистирольного планшета, со средним диаметром 10 мм, в которую уже были помещены исследуемые материалы в виде пластинок диаметром 8 мм и толщиной 2 мм и оставляли в темноте на 30, 60, 90, 120, 150 мин. Учет результатов осуществляли путем измерения оптической плотности суспензий на планшетном фотометре iMark производства компании Bio Rad через 24–48 ч после инкубации при 37 °C.

Исследование показало, что токсичность тестируемых наноструктур зависит как от модификации $Al_2O_3$, так и от содержания $TiO_2$.

Наиболее токсичными оказались композиты с содержанием γ-$Al_2O_3$. Чистый $Al_2O_3$ показал снижение роста микроорганизмов до 65% при 150 мин воздействия. Легирование $TiO_2$ увеличивает данный показатель лишь при его содержании 0,15 моль/л: снижение бактериального роста достигает 77% при 150 мин инкубации.

Менее токсичными оказались композиты, в составе которых был α-$Al_2O_3$. Чистый оксид алюминия способствовал снижению бактериального роста всего на 15% при 150 мин инкубации, что говорит о низкой токсичности материала. Наиболее эффективными показали себя композиты с содержанием $TiO_2$ 0,30 моль/л при максимальном времени воздействия этот показатель достигал 71%.

Схожие результаты были получены при тестировании композитов θ-$Al_2O_3$. Чистый $Al_2O_3$ снижал численность бактерий при 150 мин воздействия на 24%. Сокращение роста микроорганизмов при использовании НК, содержащих 0,30 моль/л $TiO_2$, значительно усиливалось (84% уменьшения численности после 150 мин инкубации).

Тестирование темновой чувствительности микроорганизмов к наноматерилам, обладающим фотокаталитическими свойствами, является первым, крайне важным этапом, для проверки эффективности метода фотовоздействия.

## Литература


1. *de Menezes, H.D.* In Vitro Photodynamic Inactivation of Plant-Pathogenic Fungi Colletotrichum acutatum and Colletotrichum gloeosporioides with Novel Phenothiazinium Photosensitizers / H.D. de Menezes, G.B. Rodrigues, S.P. Teixeira // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80, N. 5. – P. 1623–1632.
2. *Castano, A.P.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // Photodiagnosis And photodynamyc therapy. – 2004. – V. 1, N. 4. – P. 279–293.
3. *Hamblin, M.R.* Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? / M.R. Hamblin, T. Hasan // Photochemistry and photobiology science. – 2004. – V. 3, N. 5. – P. 436–450.
4. *Margarida L.* Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of *Pseudomonas syringae pv. actinidiae* Transmission by Kiwifruit Pollen / L. Margarida, M. Bartolomeu, A. Gomes // Microorganisms. – 2020. – V. 8, N. 7. – P. 1022–1038.
5. *Angarano V.* Visible Light as an Antimicrobial Strategy for Inactivation of Pseudomonas fluorescens and Staphylococcus epidermidis Biofilms / V. Angarano, C. Smet, S. Akkermans // Antibiotics. – 2020. – V. 9, N. 4. – P. 171–192.
6. Каталог штаммов «Государственной коллекции фитопатогенных организмов и сортов растений – идентификаторов (дифференциаторов) патогенных штаммов микроорганизмов» // Большие Вяземы: «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», 2009. – 129 с.
7. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флюоресцеина бактериями рода *Pseudomonas* / Е.П. Сиволодский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – N. 10. – С. 60–62.

8. *Светлакова А.В., Sanchez Mendez M., Тучина Е.С., Ходан А.Н., Traore M., Azouani R., Kanaev A., Тучин В.В.* Исследование фотокаталитической антимикробной активности нанокомпозитов на основе $TiO_2$−$Al_2O_3$ при воздействии светодиодного излучения (405 nm) на стафилококки // Оптика и спектроскопия, 2021, том 129, вып. 6. С. 736–740.

## Рамнозосодержащие гликополимеры клеточных стенок представителей семейства *Microbacteriaceae*

*Зайчиков В.А.[1], Ким Д.[1], Потехина Н.В.[1], Тульская Е.М.[1], Дорофеева Л.В.[2], Евтушенко Л.И.[2]*

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, vladislav1994zaychikov@mail.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37886

Семейство *Microbacteriaceae* включает более 60 родов актинобактерий [https://lpsn.dsmz.de/family/microbacteriaceae], виды которых зачастую ассоциированы с растениями (известны как сапрофиты и фитопатогены) [1]. Среди сахаров клеточной стенки у многих видов семейства отмечали наличие рамнозы [1]. Однако к настоящему времени гликополимеры, в том числе рамнозосодержащие, были изучены лишь у представителей 5 родов.

В докладе представлены обобщенные данные по составу и особенностям структур гликополимеров клеточных стенок актинобактерий семейства *Microbacteriaceae* (табл. 1, 2), полученные нами (роды *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rathayibacter*) и описанные в литературе (роды *Agromyces*, *Microbacterium*) [http://csdb.glycoscience.ru/].

Использованные в работе штаммы микроорганизмов (полученные из Всесоюзной коллекции микроорганизмов, https://www.vkm.ru) выращивали аэробно на пептонно-дрожжевой среде. Гликополимеры экстрагировали из клеточных стенок и исследовали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

В настоящих и проведенных ранее исследованиях показано, что в клеточных стенках изученных актинобактерий присутствуют бесфосфатные гликополимеры, в том числе тейхуроновые кислоты и нейтральные полисахариды различных типов (табл. 1). Исключение составляют представители рода *Agromyces*, у которых описаны тейхоевые кислоты – фосфатсодержащие полимеры [2]. Обнаружены также общие закономерности в распространении гликополимеров определенных типов у представителей изученных родов (табл. 2). У *Curtobacterium* и *Rathayibacter*, в частности, присутствовали рамнаны разного строения [3, 4], причем у *Rathayibacter* обычно в сочетании с тейхуроновыми кислотами [6], тогда как у *Clavibacter* обнаружены пирувилированный галактоманнан и галактофуранан [5]. Наличие рамнозы (ее L- и D-изомеров) и рамнозосодержащих гликополимеров может быть диагностическим признаком отдельных родов. Так, полимеры у всех изученных к настоящему времени представителей *Curtobacterium* построены из остатков L-рамнозы, а у *Rathayibacter* обнаружены полимеры с D-рамнозой.

С гликополимерами клеточных стенок связывают многие жизненно важные процессы в клетке – обеспечение целостности клеточной оболочки, участие в делении клетки, адаптация к стрессовым факторам, адгезия (неполярные взаимодействия) и молекулярное узнавание (лектины), образование биопленок, антигенные свойства и рецепция фагов [7]. Наличие рамнозы в составе полимеров, экспонированных на поверхности клетки, для некоторых бактерий рассматривается как фактор патогенности. Однако однозначная связь между наличием рамнозы и патогенностью отсутствует. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что рамнозосодержащие полимеры присутствуют в клеточной стенке как сапрофитных, так и фитопатогенных видов родов *Clavibacter*, *Curtobacterium* и *Rathayibacter*.

Результаты проведенной работы показывают перспективность изучения гликополимеров клеточных стенок у актинобактерий семейства *Microbacteriaceae* как с точки зрения выявления новых структур и

структурных типов полимеров природного происхождения, так и в связи с вопросами таксономии и экологии этой группы актинобактерий, выделенных из разных мест обитания, в том числе растений.

*Таблица 1*

**Распространение гликополимеров клеточных стенок у изученных представителей семейства *Microbacteriaceae***

| Роды | Гликополимеры | | |
|---|---|---|---|
| | Тейхоевые кислоты | Тейхуроновые кислоты | Полисахариды различных типов |
| *Agromyces* | + | – | – |
| *Clavibacter* | – | – | + |
| *Curtobacterium* | – | – | + |
| *Microbacterium* | – | – | + |
| *Rathayibacter* | – | + | + |

*Таблица 2*

**Разнообразие структурных типов полисахаридов у представителей семейства *Microbacteriaceae***

| Роды | Типы полисахаридов | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Галакто-фурананы | Галакто-маннаны | Рамнаны | Рамноман-наны | Другие |
| *Agromyces* | – | – | – | – | – |
| *Clavibacter* | + | + | – | – | + |
| *Curtobacterium* | – | – | + | – | + |
| Microbacterium | – | – | – | – | + |
| *Rathayibacter* | – | – | + | + | + |

## Литература


1. *Evtushenko L.I.* Family XI. *Microbacteriaceae* // Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed.), 2012. V. 5, part A. P. 807–994.
2. *Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Gnilozub V.A., Evtushenko L.I., Naumova I.B.* Poly(arabitol phosphate) teichoic acid in the cell wall of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* VKM Ac-1340$^T$ // FEBS Lett., 1995. V. 371, № 2. P. 163–166.
3. *Зайчиков В.А., Потехина Н.В, Дмитренок А.С., Дин Фань, Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* Рамнан клеточной стенки актинобактерий рода *Curtobacterium* // Микробиология, 2021. Т. 90, № 3. С. 337–343.
4. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Дмитренок А.С., Сенченкова С.Н., Зайчиков В.А., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* D-рамнан и пирувилированная тейхуроновая кислота клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2759 // Биохимия, 2021. Т. 89, № 4. С. 595–606.
5. *Kim D., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M.* Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403$^T$ // Carbohydr Res., 2021. 500:108247.
6. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренок А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ac-1603$^T$ // Биохимия, 2020. Т. 85, № 3. С. 428–437.
7. *Mistou M.-Y., Sutcliffe I.C., van Sorge N.M.* Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev., 2016. V. 40, № 4. P. 464–479.

# Бесфосфатные гликополимеры в таксономии рода *Rathayibacter*

*Зайчиков В.А.[1], Потехина Н.В.[1], Тульская Е.М.[1], Дорофеева Л.В.[2], Евтушенко Л.И.[2]*

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, vladislav1994zaychikov@mail.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37887

Изучение состава и строения гликополимеров клеточных стенок бактерий представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе микробиологии и экологии микроорганизмов. Сведения о строении гликополимеров клеточных стенок имеют также важное значение для развития системы классификации бактерий, в частности, для обоснования описания новых видов (отличия от известных видов на уровне фенотипа).

Актинобактерии рода *Rathayibacter* – коринеформные бактерии семейства *Microbacteriaceae*, имеют 2,4-диаминомасляную кислоту в составе пептидогликана (B2γ тип) и преобладающий менахинон MX-10 в дыхательной цепи. Виды рода, за исключением *R. caricis* и *R. festucae*, являются фитопатогенами, поражают пшеницу, ячмень, плевел и ряд других злаков. Для некоторых видов отмечена тесная ассоциация с фитопатогенными нематодами [1]. В настоящее время род включает 8 валидно описанных видов [https://lpsn.dsmz.de/genus/rathayibacter]. Кроме того, выявлен ряд штаммов, которые являются претендентами на новые виды [2].

Целью настоящей работы был сравнительный анализ структур гликополимеров у представителей известных и потенциально новых видов *Rathayibacter* (табл. 1).

*Таблица 1*

**Видоспецифичность гликополимеров клеточных стенок у представителей рода *Rathayibacter***

| Типы полисахаридов | Штаммы | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *R. tritici* ВКМ Ac-1603$^T$ | «*R. tanaceti*» ВКМ Ac-2596 | *R. oskolensis BKM* Ac-2121$^T$ | *R. festucae* ВКМ Ac-1390$^T$ | *R. iranicus* ВКМ Ac-1602$^T$ | *R. rathayi* ВКМ Ac-1601$^T$ | *R. caricis* ВКМ Ac-1799$^T$ | *R. toxicus* ВКМ Ac-1600 | *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2759 |
| Рамноманнан-1, Тейхуроновая кислота-1 | * | | | | | | | | |
| Рамноманнан-2 | | * | | | | | | | |
| Рамноманнан-3, Тейхуроновая кислота-2 | | | * | | | | | | |
| Рамноманнан-4, Тейхуроновая кислота-3, Рамнан-1 | | | | * | | | | | |
| Рамноманнан-5, Тейхуроновая кислота-4 | | | | | * | | | | |
| Рамноманнан-6, Тейхуроновая кислота-5 | | | | | | * | | | |
| Рамнан-2, Тейхуроновая кислота-6 | | | | | | | * | | |
| Рамноманнан-7, Глюкоманнан | | | | | | | | * | |
| Рамнан-3, Тейхуроновая кислота-7 | | | | | | | | | * |

Использованные в работе штаммы бактерий были получены из Всесоюзной коллекции микроорганизмов (https://www.vkm.ru). Культуры выращивали на пептонно-дрожжевой среде, клеточную стенку получали из разрушенных ультразвуком клеток, гликополимеры исследовали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

У всех изученных штаммов в составе клеточной стенки выявлены рамноза (наряду с другими сахарами), а также от 1 до 3-х (табл. 1) бесфосфатных полимеров разных типов – рамноманнаны, тейхуроновые кислоты, рамнозилированный глюкоманнан и D-рамнаны [3, 4]. Последние крайне редко встречаются у грамположительных бактерий [http://csdb.glycoscience.ru/]. Представитель каждого известного и потенциально нового вида *Rathayibacter* имел индивидуальный состав гликополимеров, но все содержали рамноманнан или рамнан, а также тейхуроновую кислоту (за исключением филогенетически удаленного *R. toxicus*) (табл. 1). Полимеры штаммов разных видов отличались составом моносахаридных остатков и положением гликозидных связей, объединяющих сахара в полимер.

Таким образом, выявлены общие для рода *Rathayibacter* и характерные для отдельных видов особенности состава и структуры гликополимеров, что позволяет использовать их в качестве диагностических признаков рода и видов. Результаты исследований показали перспективность дальнейшего изучения гликополимеров актинобактерий этого рода, как в плане их структурного разнообразия, так и в таксономическом аспекте.

## Литература


1. *Стародумова И.П.* Развитие системы классификации актинобактерий рода *Rathayibacter*. Автореф. дис. … канд. биол. наук. М.: ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, 2018.
2. *Tarlachkov S.V., Starodumova I.P., Dorofeeva L.V., Prisyazhnaya N.V., Leyn S.A., Zlamal J.E., Elane M.L., Osterman A.L., Nadler S.A., Subbotin S.A., Evtushenko L.I.* Complete and draft genome sequences of 12 plant-associated *Rathayibacter* strains of known and putative new species. Microbiol. Resour. Announc., 2020. V. 9, p. e00316-20.
3. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Дмитренок А.С., Сенченкова С.Н., Зайчиков В.А., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* D-рамнан и пирувилированная тейхуроновая кислота клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2759 // Биохимия, 2021. Т. 89, с. 595–606.
4. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренок А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.* Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ac-1603$^{T}$ // Биохимия, 2020. Т. 85, с. 428–437.


# Описание двух новых подвидов в рамках вида *Trichococcus shcherbakoviae*


*Захарюк А.Г., Щербакова В.А.*

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



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37888


Род *Trichococcus*, семейства *Carnobacteriaceae,* был предложен Shceff с соавт. [1] для описания новой факультативно анаэробной грамположительной кокковидной бактерии, выделенной из осадков очистных сооружений в Германии. На сегодняшний день описано девять видов рода *Trichococcus*, выделенных из различных природных и антропогенных мест (https://lpsn.dsmz.de/genus/*trichococcus*). Все виды этого рода являются психротолерантными мезофилами и могут использовать для роста широкий спектр сахаров и полиолов, что делает их перспективными объектами для биотехнологии и молекулярной биологии в качестве агентов, продуцирующих холодоактивные ферменты. Виды рода *Trichococcus* обладают высокой идентичностью последовательности гена 16S рРНК (99–100%). Между тем, значения ДНК-ДНК гибридизации (DDH) межу ними ниже 70% – порога, предложенного для описания нового вида [2, 3].

Целью работы было описание нового психротолерантного штамма рода *Trichococcus,* выделенного из донных осадков холодного минерального источника Буксыхен (Бурятия, Россия).

Из накопительной культуры железовосстанавливающих бактерий, полученной из пробы донных осадков источника и инкубируемой при 7 °C с цитратом Fe(III) и формиатом, методом селективного посева с антибиотиками, был выделен бактериальный штамм SKBG$^T$. Клетки штамма представлены кокками (1,75–2,5 мкм), соединенными в длинные цепочки. Образование спор и фимбрий не обнаружено. Филогенетический анализ на основе последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм SKBG$^T$ имеет высокий уровень сходства (98,6–99,2%) с последовательностями гена 16S рРНК типовых штаммов рода *Trichococcus*. Ближайшим родственником (99,2%) оказался *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$, выделенный из анаэробного низкотемпературного биореактора, Нидерланды [4]. Значения dDDH и ANI между штаммами SKBG$^T$ и *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$ составили 70,1 и 95,4% соответственно, что указывает на принадлежность этих двух штаммов к одному виду. Содержание Г+Ц пар в геномной ДНК штамма SKBG$^T$ составило 47.1 мол.%.

Штамма SKBG$^T$ – факультативный анаэроб, нейтрофил, оптимальный рост наблюдался при pH 7.6, оптимум NaCl составил 0–0.1%. Температурный оптимум зафиксирован при 10 °C с диапазоном развития при –5–35 °C. Использует широкий спектр источников углерода для роста, таких как D-глюкоза, D-фруктоза, D-мальтоза, D-галактоза, сахароза, лактоза, трегалоза, целлобиоза, пируват и цитрат. Не рос на формиате, ацетате, лактате, этаноле, метаноле, пептоне и дрожжевом экстракте. Не способен к автотрофному росту. В отличие от *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$, выделенный микроорганизм не использовал рибозу и рамнозу. Аннотация генома штамма SKBG$^T$ в веб-сервисе RAST с дальнейшим анализом метаболических путей в KEGG, подтвердила его способность утилизировать широкий спектр сахаров, что является типичным для всех представителей рода *Trichococcus.* Геном штамма SKBG$^T$ содержал гены, кодирующие ключевые белки цитратного цикла, такие как аконитатгидратазу (EC 4.2.1.3), которая катализирует превращение цитрата в цис-аконитат, цис-аконитата в изоцитрат, и изоцитратдегидрогеназу (EC 1.1.1.42), катализирующую окислительное дерарбоксилирование изоцитрата с образованием альфа-кетоглутарата и $CO_2$. Рост штамма на цитрате подтвердился в лабораторных испытаниях. Основными жирными кислотами клеточной стенки при оптимальной температуре роста являлись $C_{16:1}\omega9$, $C_{18:1}\omega9$ и $C_{16:0}$. Количество ненасыщенных жирных кислот у штамма SKBG$^T$ и *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$ составляло 83,5 и 75,5%, соответственно.

Таким образом, полученные результаты, основанные на анализе геномов, профиля используемых субстратов, анализа жирных кислот клеточной стенки, указывают на то, что штамм SKBG$^T$ принадлежит к виду *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$. Тем не менее, в отличие от *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$, новый изолят был выделен из природного холодного источника в Сибири, Россия. Он характеризовался температурным оптимумом для роста (10 °C), значительно более низким, чем у *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$ (20–30 °C). Количество ненасыщенных жирных кислот в клеточных стенках штамма SKBG$^T$ было на 8% выше, чем в клетках *T. shcherbakoviae* DSM 107162$^T$, что свидетельствует о лучшей адаптации к низким температурам. Согласно Meier-Kolthoff и др. [5], в настоящее время, пороговым значением для разделения подвидов внутри бактерий и архей принято считать dDDH 79–80%. На основании полученных гено- и фенотипических признаков, предложено разделить вид *Trichococcus shcherbakoviae* на два подвида и выделить штамм SKBG$^T$ как представитель нового псиротолерантного подвида – *Trichococcus shcherbakoviae* subsp. *psychrophilus* subsp. nov. (= JCM 33326$^T$=VKM B-3241$^T$). Ключевыми дифференцирующими характеристиками подвидов являются коккоидная морфология, использование широкого спектра сахаров и холодоустойчивость. Описание подвида *Trichococcus shcherbakoviae* subsp. *shcherbakoviae* subsp. nov. совпадает с описанием в оригинальной работе [4].

## Литература


1. *Scheff G., Salcher O., and Lingens F. Trichococcus flocculiformis* gen. nov. sp. Nov. A new gram-positive fdamentous bacterium isolated from bulking sludge // App Microbiol Biotechnol 1984;19:114-119.
2. *Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 2014;64:346–351.
3. *Stackebrandt E., Goebel B.M.* Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol 1994;44:846–849.

4. *Parshina S.N., Strepis N., Aalvink S., Nozhevnikova A.N., Stams A.J.M., Sousa D.Z. Trichococcus shcherbakoviae* sp. nov., isolated from a laboratory-scale anaerobic EGSB bioreactor operated at low temperature. Int J Syst Evol Microbiol 2019; 69:529-534.
5. *Meier-Kolthoff J.P., Hahnke R.L., Petersen J., Scheuner C., Michael V. et al.* Complete genome sequence of DSM 30083$^T$, the type strain (U5/41$^T$) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. Stand Genomic Sci 2014;9:2.

# Подтверждение концепции механизмов адаптивных структурных перестроек плазмалеммы дрожжей при росте на гидрофобных субстратах на основе результатов ультраструктурного анализа, полученных методом крио-замещения (Freeze – Substitition) и криофрактографии (Freeze – Fracture)

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

ВНТК трехмерных структур микроорганизмов,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, dmitrievibpm@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37889

## Цель работы

Показать на ультраструктурном уровне функционирование секреторного везикулярного аппарата дрожжевой клетки и его роль в адаптивных структурных перестройках дрожжевой плазмалеммы при росте на гидрофобных источниках углерода.

## Методы

Был применена низкотемпературная фиксации дрожжевых клеток. Низкая температура (-160 °С) и сверхбыстрая скорость охлаждения ($\geq 10^4$/сек) позволяют избегать различного рода разрушающих эффектов при препарировании образцов (кристаллизацию, рекристаллизацию и др.) и сохранить прижизненную организацию клетки. Методы крио-замещения (Freeze – Substitition) и криофрактографии (Freeze – Fracture), использованные в работе, в настоящее время считаются наиболее безартефактными методами в электронной микроскопии биологических объектов. Для решения поставленной задачи было изучено функционирование секреторного везикулярного аппарата у дрожжей в 4 модельных ситуациях. Первая модель, классическая фундаментальная, формирование почки и её отделение от материнской клетки (рис. 1, 2). Ценность этой модели заключается в том, что везикулярный секреторный поток сконцентрирован в местах формирования и отделения почек, что позволяет его выявить на ультратонких срезах. Остальные 3 модели представляли собой дрожжи при росте на гидрофобных источниках углерода, для утилизации которых необходима их модификация с помощью экзоферментов, секретируемых клетками (2 – рост на углеводородах; 3 – рост на синтетическом поверхностно–активном веществе Лауроксе 9; 4 – рост на соевой муке).

## Результаты

1. Почкование *Candida maltosa*. На рис. 1 видно, что секреторные везикулы концентрируются в зоне формирования почки. «Грузом» везикул являются строительный материал клеточной стенки (различные сахара, фосфаты и др.) и ферменты синтеза основных компонентов клеточной стенки (глюканов, маннанов, хитина, полифосфатов и некоторых белков). Мембраны «разгруженных» секреторных везикул согласно известному механизму (рис. 3) встраиваются в плазмалемму, увеличивая её площадь. Таким образом, происходит формирование новой клетки путем почкования. При отделении новой клетки (рис. 2) – почки от материнской происходит деструкция клеточной стенки в определенных местах, в которых в последствии образуются почечные рубцы. При этом, предполагается два разнонаправлен-

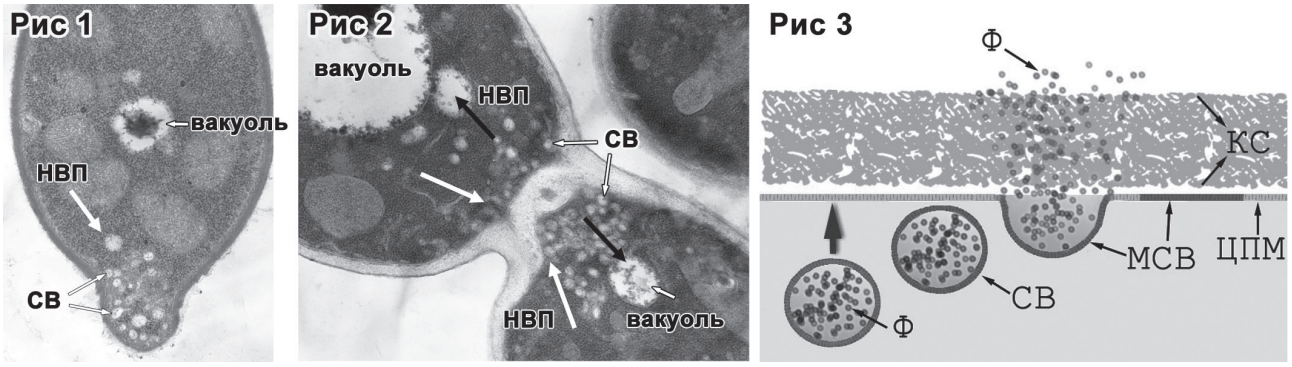



**Рис. 1.** Метод крио-замещения. Ультратонкий срез. Образование почки

**Рис. 2.** Метод крио-замещения. Ультратонкий срез. Отделение новой клетки от материнской. СВ – секреторные везикулы; НВП – направление потока везикул, белые стрелки – к месту формирования и отделения почки, черные стрелки – направление потока везикул к вакуолям.

**Рис. 3.** Схема встраивания секреторных везикул в плазмалемму дрожжей. Ф – ферменты; СВ – секреторные везикулы; МСВ – мембрана секреторных везикул; ЦПМ – плазмалемма; КС – клеточная стенка

ных везикулярных потока: один – с гидролазами клеточной стенки, другой с продуктами гидролиза в вакуолях.

2. Ультраструктурные изменения в плазмалемме трех видов дрожжей *Candida maltosa*, *Cryptococcus humicola* и *Saccharomycopsis lipolytica* при потреблении гидрофобных субстратов (гексадекан, поверхностно-активное вещество Лаурокс 9 и соевая мука) были изучены с помощью электронно-микроскопического криофрактографического метода без использования криопротекторов и химической фиксации. Для утилизации этих субстратов необходима их модификация с помощью экзоферментов, секретируемых клетками. Было обнаружено, что в первые часы инкубации на этих субстратах (лаг-фаза роста) в плазмалемме появляются характерные структуры: сферические инвагинации у *Candida maltosa*, «карманоподобные» инвагинации у *Cryptococcus humicola* и инвагинации, в которых цитохимическим методом была показана локализация липазы, у *Saccharomycopsis lipolytica*. Было сделано предположение, что появление характерных инвагинаций связано с увеличением площади плазмалеммы обусловленной встраиванием мембран секреторных везикул, транспортирующих ферменты, необходимые для структурных адаптивных перестроек клеточной оболочки и первичной модификации ростовых гидрофобных субстратов.

На основании цито-биохимических и морфометрических данных впервые была показана значительная вариабельность морфологии плазмалеммы у дрожжей в различных физиологических ситуациях. Были обнаружены три типа адаптивных структурно-функциональных перестроек плазмалеммы. Мы предполагаем, что эти изменения обусловленны активизацией секреторных процессов, приводящих к увеличению её площади.

1. У дрожжей сферические инвагинации плазмалеммы являются частью «каналов», участвующих в первичной модификации углеводородного субстрата. Встраивание в этих зонах плазмалеммы секреторных везикул, вероятно, приводит к образованию сферических инвагинаций.

2. Формирование петлевидных инвагинаций у *Cryptococcus humicolus* при утилизации ПАВ связано адаптационным периодом, обусловленным увеличением общей площади плазмалеммы при активизации везикулярных процессов, связанных с модификацией клеточной стенки и транспортом гидролаз ПАВ. Причем формирование этих структур носит временный характер (период лаг-фазы). Это явление происходит видимо в связи с тем, что клеточная стенка ограничивает возможности увеличения площади ПМ и при этом временно образуются петлевидные инвагинации.

3. У дрожжей *Saccharomycopsis lipolytica* при росте на соевой муке в качестве источника углерода в первые часы культивирования была отмечена высокая активность везикулярного аппарата клеток (рис. 6, а).

Таким образом, на основании цито-биохимических и морфометрических данных впервые была показана значительная вариабельность морфологии плазмалеммы у дрожжей в различных физиологических ситуациях (рис. 7). Были обнаружены три типа адаптивных структурно-функциональных перестроек

плазмалеммы. Мы предполагаем, что эти изменения обусловлены активизацией секреторных процессов, приводящих к увеличению её площади.

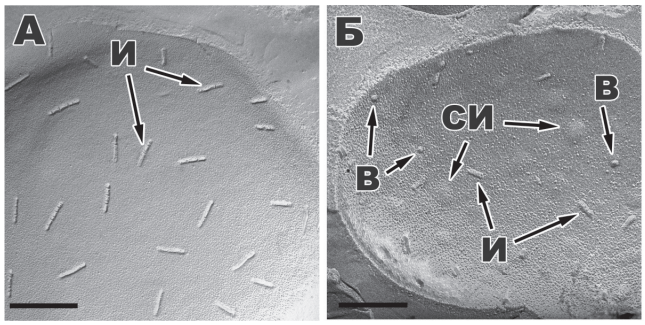



**Рис. 4.** Углеродно-платиновая реплика криофрактографического скола Candida maltosa. А – при росте на глюкозе; Б – первые 5 часов культивирования на гексадекане. И – инвагинации (обычные); СИ – сферические инвагинации; В – везикулы. Метка 0,5 мкм

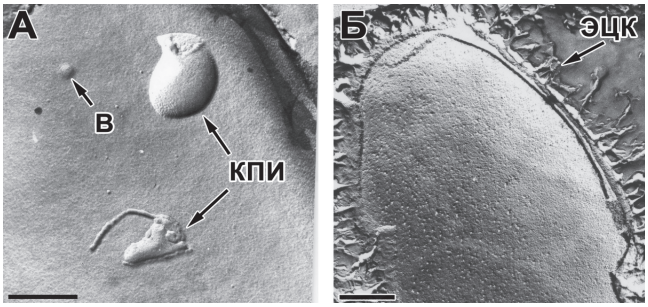



**Рис. 5.** Cryptococcus humicolus при росте на поверхностно-активном веществе – Лауроксе 9. А – криофрактографический скол плазмалеммы при культивировании в течение 2-х часов; Б – криофрактографический скол плазмалеммы у клеток, взятых из логарифмической фазы роста на при росте на Лауроксе 9. КПИ- карманоподобные инвагинации; В – везикулы; ЭЦК – экзоцеллюлярные компоненты. Метка 0,5 мкм

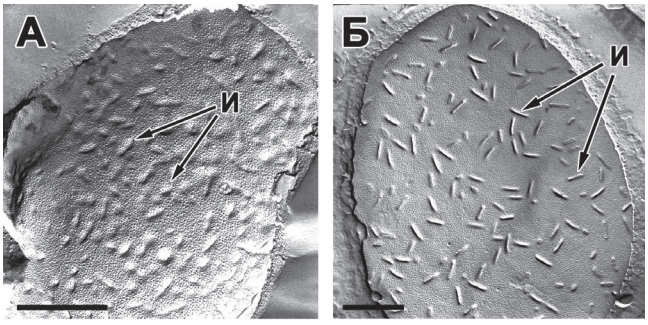



**Рис. 6.** Saccharomycopsis lipolytica криофрактографические сколы ПМ. А – липолитически активные клетки в первые часы культивирования, Б – логарифмическая фаза роста на соевой муке. И – инвагинации. Метка 0,5 мкм

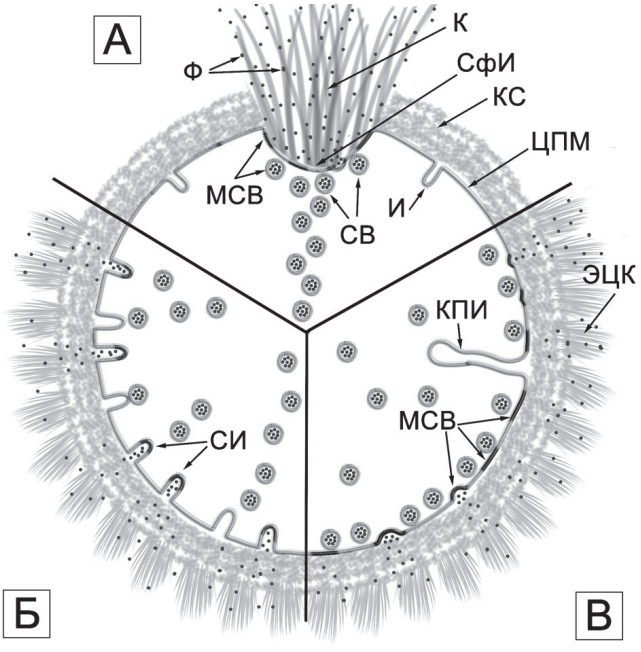



**Рис. 7.** А. Рост на углеводородах; Б. Рост на соевой муке; В. Рост на поверхностно-активном веществе – Лауроксе 9. Ф – ферменты, МСВ – мембраны секреторных везикул, СВ – секреторные везикулы,СфИ – сферическая инвагинация, КС – клеточная стенка, К – канал, ЦПМ – плазмалемма, И – инвагинации, КПИ – карманоподобные инвагинации, СИ – секреторные инвагинации

Представленные в работе данные важны для понимания функционирования дрожжевой плазмалеммы, так как до настоящего времени многие исследователи придерживаются мнения о том, что инвагинации (или эйзисомы) плазмалеммы представляют собой строго консервативный клеточный аппарат, который даже называют органеллой без очевидных физиологических функций.

## Литература


1. *Dmitriev V.V., Crowley D., Rogachevsky V.V., Negri C.M., Rusakova T.G., Kolesnikova S.A., Akhmetov L.I.* Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media. *FEMS Microbiol Lett* 2011;315: 134-140.
2. *Dmitriev V.V., Crowley D., Zvonarev A.N., Rusakova T.G., Negri M.C., Kolesnikova S.A.* Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. *Yeast* 2016; 33(2): 55-62.
3. *Дмитриев В.В., Бибикова И.И., Офицеров Е.И., Наумова Р.П.* О дрожжах, утилизирующих поверхностно-активное вещество лаурокс-9. Микробиология 1988;57(2):223-230.
4. *Fikhte B., Zaichkin E., Ratner E.* New methods of the physical preparation of biological objects for electron-microscopic investigations. Nauka Press Moscow (Russ.) 1973:49-91.
5. *Lee J-H., Heuser J.E., Roth R., Goodenough U.* Eisosome ultrastructure and evolution in fungi, microalgae, and lichens. *Eukaryot Cell* 2015;14:1017–1042.
6. *Scazzocchio C., Vangelatos I., Sophianopoulou V.* Eisosomes and membrane compartments in the ascomycetes. Commun Integr Biol 2011;4:64-68.


# Микроорганизмы корневой зоны *Miscanthus* × *giganteus*, проявляющие устойчивость к тяжелым металлам и стимулирующий рост растений потенциал


*Зеленова Н.А.[2], Муратова А.Ю.[1], Плешакова Е.В.[2]*

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук,

[2] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, n.a.zelenova98@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37890


*Miscanthus* × *giganteus* – биоэнергетический вид растений, образующий большую биомассу, которая используется для производства биотоплива. Кроме того, мискантус проявляет высокую устойчивость к загрязнению тяжёлыми металлами (ТМ) без потери продуктивности и является эффективным фиторемедиантом загрязнённых почв [1]. Высаживание энергетических культур на загрязнённых почвах, непригодных для производства продуктов питания, может решить проблему площадей под выращивание растений для целей биоэнергетики и способствовать восстановлению нарушенных земель. Обитающие в корневой зоне растения-фиторемедианта микроорганизмы могут изменять транслокацию металлов и оказывать влияние на его рост и развитие как непосредственно (через микробную азотфиксацию, синтез сидерофоров, фитогормонов и других активных соединений), так и косвенно, изменяя биодоступность металлов и питательных веществ. В этой связи, изучение ризомикрофлоры растений-фиторемедиантов, оценка изменения численности почвенных микроорганизмов в ризосфере под влиянием ТМ может рассматриваться как инструмент мониторинга здоровья почвы. Выделение устойчивых к поллютантам штаммов микроорганизмов, близко ассоциированных с растениями, может послужить основой для создания биопрепаратов, обеспечивающих рост растений-фиторемедиантов для очистки загрязнённой почвы.

Целью работы являлось выделение из корневой зоны *M.* × *giganteus* устойчивых к тяжелым металлам ризобактерий, характеристика их устойчивости по отношению к двухвалентным металлам (Cu, Zn, Ni) и оценка их стимулирующего рост растений потенциала.

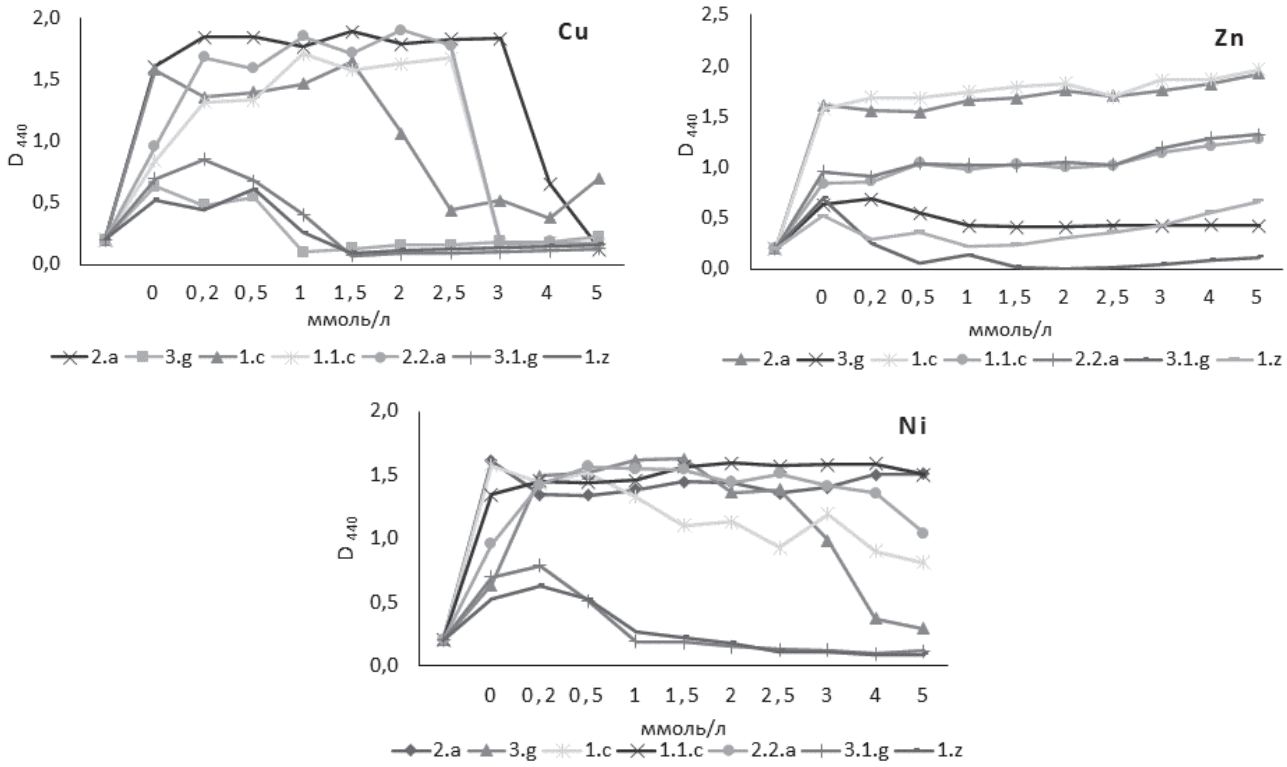



**Рис.** Влияние $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$ и $Ni^{2+}$ на рост выделенных из ризосферы *M.× giganteus* микроорганизмов в жидкой среде LB

Растения *M. × giganteus* выращивали в искусственно загрязнённой тяжелыми металлами (Zn и Pb) почве в контролируемых условиях лабораторного вегетационного опыта в течение 6 мес. По окончании эксперимента с использованием метода Коха проводили высев и учёт микроорганизмов из образцов ризосферной почвы. В результате проведённого анализа было получено 23 изолята ризобактерий, которые были подробно исследованы на устойчивость к металлам и стимулирующий рост растений потенциал.

Для всех микроорганизмов была определена устойчивость к металлам, которую оценивали по росту, культивируя выделенные штаммы как на агаризованной, так и в жидкой среде LB, содержащей ионы двухвалентных металлов $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$ и $Ni^{2+}$ в концентрациях 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 и 5,0 ммоль/л. Были определены значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и максимальной толерантной концентрации (МТК) металлов.

Согласно полученным результатам из трёх исследованных металлов наиболее токсичным оказалась медь, а наименее токсичным никель. Из 23 проанализированных микроорганизмов четыре проявляли устойчивость к $Zn^{2+}$ (2.a и 1.c – к 3 ммоль/л; 2.2.a и 1.1.c – к 2,5 ммоль/л), четыре – устойчивость к $Ni^{2+}$ (2.a, 2.2.a, 1.c и 1.1.c – к 3 ммоль/л) и только один штамм проявлял устойчивость к $Cu^{2+}$ (1.b, 2 ммоль/л). На рисунке показана динамика роста некоторых штаммов в присутствии ионов исследуемых металлов.

Из представленных данных можно отметить кривую роста штамма 1.c на среде с ионами $Cu^{2+}$. Наблюдаемое ингибирование роста этого штамма при 2,5 ммоль/л с последующим ростом при 5 ммоль/л может указывать на эффект «парадоксальной токсичности» металла и свидетельствовать об активации дополнительного механизма устойчивости микроорганизма к токсиканту.

У всех выделенных штаммов исследовались признаки, характерные для стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR): способность ассимилировать атмосферный азот оценивали по росту на безазотистой среде; способность мобилизовать фосфор из трудно растворимых фосфатсодержащих соединений у исследуемых изолятов оценивали по образованию зон растворённого фосфата кальция на среде Муромцева; способность синтезировать сидерофоры – органические соединения, образующие хелатные комплексы с железом, проводили с использованием CAS-агара; способность синтезировать фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) при росте на среде с триптофаном оценивали качественным методом по Сальковскому.

Установлено, что способность к фиксации атмосферного азота наиболее часто (60%) встречалась у исследованных штаммов. У 21% изолятов обнаруживалась способность к продукции сидерофоров, у 39% – способность к синтезу фитогормона ИУК. Наименее распространённым оказался признак растворения фосфатов – лишь 17% штаммов проявляли это свойство. Среди изученных микроорганизмов особое внимание заслуживал штамм 3.g, который проявлял все исследуемые свойства, а также штаммы 3.1.g и 1.z, проявившие три из четырёх анализируемых свойств. В целом, по результатам исследований было отобрано 7 штаммов, выделяющихся устойчивостью к ТМ и PGPR-свойствами: 2.a, 2.2.a, 1.c, 1.1.c, 3.g,3.1.g и 1.z.

Сочетание устойчивости к тяжёлым металлам и стимулирующей рост растений активности в одном микроорганизме или в сообществе отобранных штаммов при инокуляции ими растений мискантуса для задач фиторемедиации может повысить эффективность технологии за счёт усиления роста растения в загрязнённом металлами грунте.

## Литература

1. Cadmium and mercury phytostabilization from soil using *Miscanthus* × *giganteus* / Z. Zgorelec et al. // Scientific Reports. 2020. V. 10. 6685.

# Микробная железоредукция в арктических пробах, сопряженная с образованием метана

*Зиновьева О.В.[1,2], Захарюк А.Г.[1], Щербакова В.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
[2] Пущинский государственный естественно-научный институт,
olga.azizova98@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37891

Учитывая, что железо относится к химическим элементам с переменной валентностью и является одним из самых распространенных в земной коре, окислительно-восстановительные реакции с участием этого элемента имеют большое значение для поддержания значительных микробных популяций в почве и осадках. Показано, что микробные процессы восстановления железа могут создавать благоприятные условия для развития сообщества метаногенных архей, стимулируя тем самым биогенный процесс метанообразования [1–3]. Из данных, полученных японскими учеными следует, что наличие в среде оксидов железа (III) стимулировало клеточный перенос электронов от железовосстанавливающих бактерий (ЖВБ) к метаногенам через небиологические материалы, минералы, содержащие в себе железо, что приводило к ускорению метаногенеза [4].

Целью работы было определение процессов микробной железоредукции и метаногенеза в накопительных культурах, полученных из проб многолетнемерзлых отложений (ММО) Российской Арктики.

В работе использовались пробы мерзлоты, предоставленные лабораторией криологии почв (ИФХиБПП РАН). Пробы были отобраны в районах Мамонтовой Хайяты (горизонты: Bg; н\м; 2–4 (в мерзлоте) см) и Ивашкиной лагуны (Tg; $G_2$; $GC_3m$ (70)), находящихся на губе Буор-Хая, в южной части моря Лаптевых, к юго-востоку от дельты реки Лена.

Из различных горизонтов ММО нами было получено 24 накопительные культуры железовосстанавливающих бактерий, способных восстанавливать соединения железа (III) с формиатом и ацетатом, в качестве источника углерода и донора электронов при температурах культивирования 6 и 15 °С. В качестве терминальных акцепторов электронов были использованы такие распространенные формы восстанавливаемого железа как слабокристаллический оксид железа в виде аморфной гидроокиси окисного железа (АГОЖ) и цитрат железа.

Через 30 суток культивирования при температуре инкубации 15 °С содержание ионов Fe (II) в накопительных культурах (н/к) варьировало от 0,2 мМ до 15 мМ. Максимальные количество (15 мМ) Fe (II) было зафиксировано в н/к **в/м**, полученной из пробы, отобранной в мерзлоте (2-4 см) и выращенной с АГОЖ в качестве акцептора электронов. Количество восстановленного железа при температуре 6 °С в накопительных культурах составляло от 0,3 до 10 мМ. Максимальное значение наблюдалось в н/к **Tg** (10 мМ), отобранной из почвенных проб верхнего горизонта Ивашкиной лагуны, выращенной с цитратом Fe (III).

В результате микроскопических исследований полученных н/к ЖВБ, было обнаружено несколько морфотипов клеток бактерий. В каждом из рассмотренных образцов присутствовали подвижные и неподвижные палочки разных размеров. При микроскопии таких н/к как **Tg, Bg** и **в/м** встречались клетки со спорами.

Во всех н/к ЖВБ был исследован процесс метанообразования. Максимальное количество метана было зафиксировано в н/к **Tg,** полученной из пробы, отобранной с верхнего горизонта мерзлоты в районе Ивашкиной лагуны, инкубированной при 15 °С – 11% $CH_4$, и при 6 °С – 10% $CH_4$ с АГОЖ в качестве акцептора электронов. Минимальное значение получено в н/к $\mathbf{G_2}$, взятой из среднего горизонта Ивашкиной лагуны, выращенной с цитратом Fe (III) в качестве акцептора электронов при температуре 15 °С 0,4% $CH_4$, и из н/к **н/м**, полученной из почвенной пробы с Мамонтовой Хаяты, отобранной над мерзлотой, инкубируемой при 6 °С и результатом 0,2% метана. В десяти н/к ЖВБ метан не был обнаружен (рис. 1).

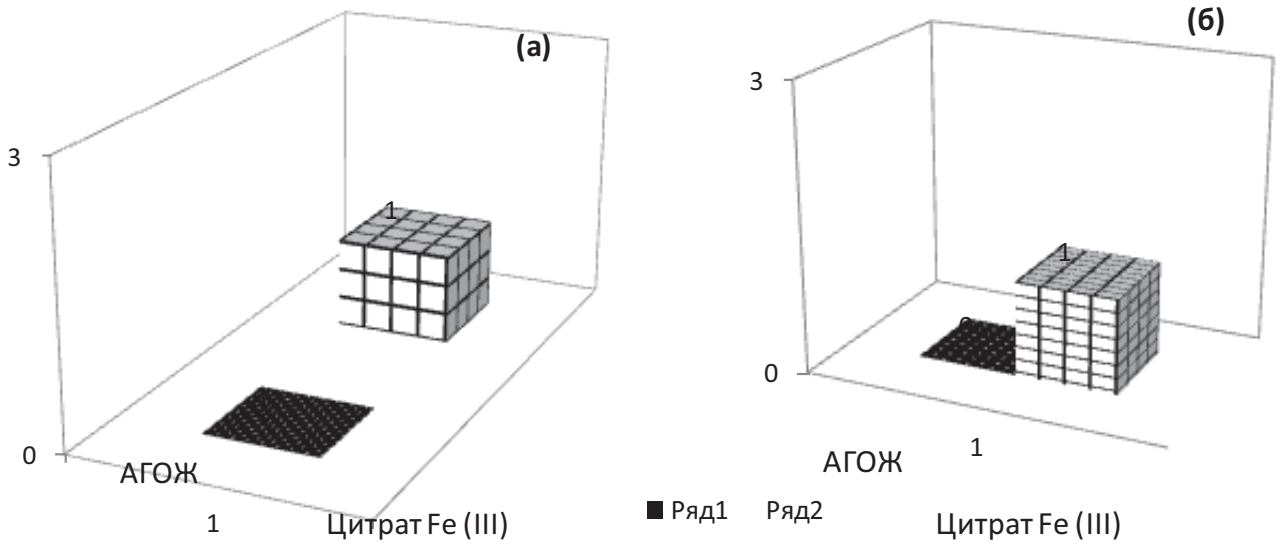



**Рис. 1.** Количество $Fe^{2+}$ и метана в накопительных культурах, полученных из образцов вечной мерзлоты Арктики а) 15 °С, б) 6 °С

Таким образом, проведенные исследования показали, что в экстремально холодных местах обитания с постоянно низкой температурой активно функционирует микробное сообщество, восстанавливающее трехвалентное железо. В ходе работы были получены накопительные культуры психрофильных и психротолерантных ЖВБ. Цитрат Fe (III) оказался более предпочтительным акцептором электронов. Показано, что температура инкубации влияет на активность процесса восстановления железа (III). В 60% полученных накопительных культур ЖВБ было зафиксировано образование метана. Дальнейшее изучение и описание процессов, связанных с восстановлением трехвалентного железа, позволят оценить вклад ЖВБ в биогенный процесс метанобразования.

## Литература

1. *Ривкина Е.М., Федоров-Давыдов Д.Г., Захарюк А.Г., Щербакова В.А., Вишнивецкая Т.А.* Свободное железо и железовосстанавливающие микроорганизмы в почвах и многолетнемерзлых отложениях северо-востока Сибири//Почвоведение. 2020; N 10. С. 1247–1261.

2. *Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Литти Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А.* Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах// Микробиология 2020; Т.89, N 2. С. 131–151.
3. *Barua S., Dhar B.R.* Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion // Bioresour. Technol. 2017; V. 244. C. 698–707.
4. *Kato S., Hashimoto K., Watanabe K.* Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals// Environ Microbiol. 2012; V.14. C. 1646–1654.

# Микроорганизмы-деструкторы ароматических углеводородов в градиенте функциональных зон города Москва

*Иванова А.А.[1], Ветрова А.А.[1], Сазонова О.И.[1], Петриков К.В.[1], Стрелецкий Р.А.[4], Саржанов Д.А.[2], Корнейкова М.В.[2,3], Гавричкова О.В.[5]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
[2] Российский университет дружбы народов
[3] Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН
[4] Московский государственный университет
[5] Научно-исследовательский институт наземных экосистем, Национальный исследовательский совет, Порано, Италия

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37892

Одной из существенных проблем является загрязнение урбаэкосистемы полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Накопление ПАУ в окружающей среде представляет собой серьезную опасность, поскольку многие из этих соединений токсичны и канцерогенны. ПАУ образуются как в результате природных процессов, так и за счет деятельности человека. В современных мегаполисах концентрация ПАУ в атмосфере может достигать 10 нг/м$^3$ и даже превышать этот уровень в несколько раз в промышленных районах. Было показано, что ПАУ входят в состав твердых частиц атмосферного аэрозоля (пыли), наряду с сульфатами, нитратами, аммиаком и микроэлементами (тяжелые металлы). Одним из наиболее вредных загрязнителей, связанных с городской средой, является мелкодисперсная пыль. Известно, что растения могут накапливать большое количество пыли на поверхности листьев, при этом количество ПАУ, накопленное на поверхности листьев коррелирует с количеством этих соединений, содержащихся в атмосферном воздухе. Адсорбируясь на твердых частицах пыли, ПАУ оседают также на запечатанные поверхности (асфальт, бетонные покрытия, поверхность стен зданий и т.д.), которые в свою очередь могут служить депо пыли, особенно в городах, где запечатанные поверхности весьма распространены.

Целью данной работы была оценка количества ПАУ в образцах твердых частиц пыли, а также выделение и характеристика штаммов-деструкторов ароматических углеводородов в городских территориях с контрастной антропогенной нагрузкой.

Отбор пыли с поверхности асфальта и листовых пластинок проводили в Москве в июне 2021 года. Поскольку пространственная структура городов имеет функциональное зонирование, определяющее степень антропогенного воздействия на экосистемы, то отбор проб проводили в следующих зонах: рекреационная (район РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева), селитебная (район РУДН) и промышленная (район ИГРАН).

Микробная обсемененность частиц пыли, собранной с асфальта, была одинаковой для всех трёх зон (около $4\times10^6$ КОЕ/г пыли). Этот показатель, полученный со смывов с листовых пластинок (около $3\times10^6$ КОЕ/мл), был на порядок выше в рекреационной зоне по сравнению с селитебной и промышленной зоной.

Образцы пыли использовали для выделения микроорганизмов-деструкторов ароматических углеводородов двумя способами – методом прямого высева и накопительным культивированием. Изоляцию

штаммов проводили на минеральной среде с добавлением одного из следующих субстратов в качестве единственного источника углерода и энергии: бенз(а)пирена, фенантрена, нафталина, антрацена и бензола. Бензол был выбран как простейший ароматический углеводород, входящий в состав бензина, нефти и синтетической резины.

Всего было выделено 75 морфотипов бактериальных штаммов. Количество морфотипов штаммов-деструкторов, выделенных с каждого сайта в каждой зоне приведены в таблице 1.

Наибольший процент углеводородокисляющих штаммов представлен в образцах пыли селитебной зоны. Доля штаммов-деструкторов, выделенных с асфальта превышала долю штаммов деструкторов, полученных со смывов с листовых пластин.

Для проверки того, насколько близки друг другу выделенные из проб микроорганизмы и к каким популяционным группам они относятся, проводился геномный фингерпринтинг с использованием праймера $(GTG)_5$. Полученный электрофоретический профиль был нормализован и преобразован в бинарную матрицу. С использованием алгоритма neighbor joining и программы PyElph 1.4 была получена кластерная дендрограмма. Анализ кластерной дендрограммы показал высокое биоразнообразие у выделенных микробных штаммов и ни по одному форм-фактору (зона выделения, способ выделения, сайт выделения, ростовой субстрат) не выявлено достоверной кластеризации.

*Таблица 1*

**Морфотипы штаммов-деструкторов и их количество, выделенных в работе**

| | Рекреационная зона | Промышленная зона | Селитебная зона | Рекреационная зона | Промышленная зона | Селитебная зона |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Пыль с асфальта | | | Смывы с листовой пластины | | |
| Прямой высев | 8 | 9 | 22 | 2 | 1 | 1 |
| субстраты | 4Ф, 1БП, 1Н, 1Б, 1А | 4А, 1Б, 2Ф, 2БП | 8БП, 8Ф, 5Б, 1Н | БП | Б | БП |
| Накопительное культивирование | 10 | 14 | 2 | 6 | 0 | 0 |
| субстраты | 1Ф, 9БП | 10 БП, 4Ф | 1Б, 1Ф | 6Б | | |
| ИТОГО | 18 | 23 | 24 | 8 | 1 | 1 |

* БП-бензапирен, А-антрацен, Ф-фенантрен, Б-бензол, Н-нафталин.

Оценку количества углеводородов в образцах пыли проводили методами газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Оценка количества ПАУ выявила увеличение бензантрацена, пирена, хризена и флуорантена в пыли, собранной с запечатанных поверхностей (асфальт) в промышленной зоне. Количество нафталина было в 1,5 раза выше в селитебной и промышленной зонах по сравнению с рекреационной зоной. В пыли, собранной с листовых пластинок в промышленной зоне показано увеличение пирена, нафталина, фенантрена, флуорена и флуорантена по сравнению с селитебной и рекреационной зонами. Судя по всему, уровень пирена и флуорантена непосредственно связан с близостью автомобильных дорог.

Было обнаружено, что количество пыли, отобранной с асфальта в промышленной зоне, было в 2 раза выше по сравнению с другими зонами, что оказалось сопоставимо с результатами содержания углеводородов высококипящей фракции. В тоже время количество пыли, смытой с листовых пластинок деревьев, произрастающих в промышленной зоне, было в 3 раза меньше по сравнению с рекреационной зоной и в 2 раза меньше по сравнению с селитебной зоной. Это может быть связано с различной стратегией уборки территорий в зонах исследования: так, мойка дорожного покрытия может снизить дисперсию пыли на листовые поверхности.

Сопоставление результатов химического анализа и микробного разнообразия деструкторов ПАУ позволит оценить способности урбаэкосистемы к самовосстановлению.

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

# Вклад очистных сооружений г. Пущино в загрязнение поверхностных вод реки Ока антибиотикорезистентными микроорганизмами

*Измалкова Т. Ю., Сазонова О.И., Воронкова А.Д., Кошелева И.А.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), tatiz@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37893

Постоянно повышающийся уровень антимикробных препаратов в окружающей среде в настоящее время является глобальной экологической проблемой, поскольку приводит к селекции резистентных к ним бактерий и появлению новых детерминант устойчивости. Реки являются важным связующим звеном между городскими и сельскими экосистемами. Антимикробные препараты и антибиотикоустойчивые микроорганизмы попадают в водную среду путем сброса сточных вод очистных сооружений в поверхностные или грунтовые воды, ливневых стоков с сельскохозяйственных угодий, а также в результате применения антибиотиков в аквакультуре. Консорциумы водных микроорганизмов становятся очагами горизонтального переноса генов устойчивости к антимикробным препаратам. Таким образом, мониторинг устойчивости к антибиотикам микробных сообществ рек, которые находятся под сильным антропогенным воздействием, может дать некоторое представление о распространении антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант антибиотикорезистентности в водной среде, что является необходимым для выработки потенциальных превентивных мер.

Река Ока с площадью водосбора 245 тыс. км$^2$ и общей длиной 1500 км является рыбохозяйственным водным объектом высшей категории. Город Пущино Московской области (около 20 тысяч населения) не содержит на своей территории крупных производств, поэтому основным источником попадания в водную среду антибиотиков и антибиотикорезистентных штаммов служат коммунально-бытовые сточные воды.

Три пляжа в окрестностях г. Пущино выбраны для отбора проб воды, седиментов и песка береговой линии реки Оки: городской пляж г. Пущино (2), пляж отеля Царьград (1), расположенный в 3 км вверх по течению, и пляж в 1.8 км вниз по течению (3), расположенный ниже пристани и испытывающий влияние стоков с очистных сооружений г. Пущино. Пляж отеля Царьград, который больше года закрыт для посещения, был выбран в качестве контрольной точки минимального антропогенного воздействия. Пробы воды на глубине 0.5 м и донных отложений у береговой линии под слоем воды 5 см были взяты из трёх точек с каждого сайта, кроме того, методом конверта были отобраны пробы песка участков пляжа.

Общая численность культивируемых микроорганизмов была сходной во всех пробах воды и составляла $1.59\times10^3 – 2.69\times10^3$ клеток/мл образца. Высевы на полноценную среду (L-агар), содержащую один из перечисленных антибиотиков в соответствующих концентрациях: тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), гентамицин (10 мкг/мл), цефтазидим (20 мкг/мл), цефепим (20 мкг/мл) и меропенем (20 мкг/мл), продемонстрировали почти десятикратное увеличение содержания микроорганизмов, устойчивых к аминогликозидам (канамицину, стрептомицину и гентамицину) в пробах воды, отобранных ниже сброса сточных вод очистных сооружений. Микроорганизмы, устойчивые к цефалоспоринам III-го и IV-го поколения, были обнаружены во всех пробах, однако их концентрация также была выше в воде зоны пляжа 3. Следует отметить, что в образцах воды всех трех зон наблюдалась крайне низкая численность микроорганизмов, устойчивых к тетрациклину (1–2 КОЕ/мл), что может свидетельствовать об отсутствии загрязнения исследуемого участка р. Оки отходами животноводства.

Ранее нами было показано, что одними из наиболее часто встречающихся культивируемых антибиотикоустойчивых микроорганизмов в очистных сооружениях г. Пущино являются бактерии родов *Pseudomonas*. В исследуемых пробах воды доля псевдомонад составила 8–10% от общей численности культивируемых микроорганизмов. Анализ устойчивости к антибиотикам показал, что только 16% штаммов псевдомонад, изолированных из проб воды, седиментов и песка пляжа отеля Царьград устойчивы к трём и более используемым антибиотикам, а 18% – чувствительны ко всем используемым. Для

городского пляжа и пляжа за лодочной станцией эти доли распределялись 47% и 17%, и 75% и 1.5% соответственно.

## Динамика комплексов микромицетов в процессе зарастания угольных отвалов угольных шахт в районе г. Воркута

*Ильюшин В.А.*

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, ilva94@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37894

На сегодняшний день все более актуальной становится проблема загрязнения окружающей среды из-за угледобывающей деятельности. При добыче каменного угля, природные экосистемы замещаются техногенными, которые могут распространяться, в случае продолжительной масштабной эксплуатации угольных шахт и карьеров, на значительные территории (Егорова и др., 2013). Рекультивация нарушенных земель является важнейшей экологической проблемой. Особенно актуальным является этот вопрос в суровых условиях Арктики Воркутинского района Республики Коми, где промышленная добыча угля продолжается с 30-х годов XX века.

Целью исследования было изучение динамики комплексов микромицетов угольных отвалов в процессе их зарастания в условиях Арктики (север республики Коми).

Пробы породы отвалов разных возрастов (формируемые отвалы, 10-, 20- и 45-летние) были отобраны вблизи г. Воркута (67°30′ с.ш. 64°02′ в.д.). В качестве контроля использовали почвы южной тундры. Чистые культуры микромицетов выделяли на среде Чапека (CZ) при различных температурных режимах (20 °C и 5 °C). Таксономическую принадлежность выделенных микромицетов определяли на основании культурально-морфологических признаков (Domsch et al., 2008), а также с помощью молекулярных методов. Так, в качестве филогенетического маркера использовали последовательность региона ITS (White et al., 1990). Показатели биомассы определяли методом люминесцентной микроскопии (Hoch et al., 2005). Для изучения сходства комплексов микромицетов использовали метод древовидной кластеризации (Ward, 1963).

Из исследованных образцов угольных отвалов разных возрастов республики Коми было выделено 1928 колоний. В результате проведенных исследований выявлено 39 видов микроскопических грибов, принадлежащих к 29 родам. С возрастом отвалов увеличивалось число видов. Так, если из пород формируемого отвала выделили 8 видов, то из 45-летнего 14. Численность по посеву и биомасса постепенно росли с возрастом отвалов. С возрастом отвалов также изменялись процентные соотношения представленных видов среди всех выделенных изолятов (удельное обилие). Так, доля грибов рода *Cladosporium* оставалась около 20% в более молодых отвалах, а затем, снижалась до 3% в 45-летнем отвале. В результате проведенного кластерного анализа, комплексы микромицетов разделялись на четыре кластера, соответствующие возрастам отвалов. Причем, сообщества отвалов были гораздо ближе между собой, чем с сообществом южной тундры. Это свидетельствует о том, что процесс формирования микобиоты, характерной для естественных почв данного региона, протекает крайне медленно.

В 20-летнем породном отвале шахты Комсомольская нами был обнаружен ацидофильный вид *Acidea extrema*. До этого, этот микромицет обнаруживался в различных экстремальных экосистемах, таких как угольные карьеры Чехии, Антарктические пустыни и хвостохранилища месторождения киновари в республике Алтай.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о присутствии микромицетов в породных отвалах угля разных возрастов. С увеличением времени, прошедшего после остановки эксплуатации породного отвала, последовательно увеличивается число видов, возрастает численность и биомасса, что свидетельствует об увеличении стабильности комплексов и происходящих изменениях в процессе сукцессии.

## Литература

1. *Егорова Л.Н., Щапова Л.Н., Ковалева Г.В. и др.* Почвенные микромицеты техногенных ландшафтов на юге Приморского края // Микология и фитопатология. 2013. Т. 47. № 4. С. 218–222.
2. *Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H.* Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, 2007.
3. *Hoch H.C., Galvani C.D., Szarowski D.H. et al.* Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. Mycologia. 2005. V. 97 (3). P. 580–588.
4. *Ward J.* Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Amer. Statistical Association. 1963. V. 58. P. 236–244.
5. *White T.J., Bruns T., Lee S. et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. (eds), PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif, 1990. P. 315–322.


# Характеристика и геномный анализ бактериофага *Pseudomonas* Pf-10


*Казанцева О.А.[1], Бузиков Р.Б.[1], Пилипчук Т.А.[2], Валентовия Л.Н.[2,3], Коломиец Э.И.[2], Шадрин А.М.*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), лаборатория биологии вирусов бактерий, Пущино, РФ, Olesyakazantseva@bk.ru
[2] Институт микробиологии Национальной академии наук Беларусии, Минск
[3] Белорусский государственный университет, Биологический факультет, Минск



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37895


Болезни растений, вызываемые *Pseudomonas*, широко распространены во всем мире и поражают большое количество высших растений, включая важные сельскохозяйственные культуры, что приводит к потере прибыли агробизнеса и другим косвенным убыткам, которые в конечном итоге оказывают негативное влияние на мировые запасы продовольствия и экономику. Фитопатогенные *Pseudomonas* вызывают широкий спектр заболеваний растений: некротические поражения плодов, стеблей и листьев, гиперплазии (галлы), мацерации тканей (гнили), язвы, болезни и сосудистые инфекции (увядания). Важной частью сельскохозяйственного сектора является защита сельскохозяйственных культур от патогенов на всех этапах роста растений. Используемые в настоящее время сельскохозяйственные стратегии борьбы с бактериальными инфекциями (например, применение бактерицидов, таких как соединения меди [1–3], применение антибиотиков [4] и т.д.) могут представлять серьезную угрозу, как для окружающей среды, так и для здоровья населения. Более того, ситуация усугубляется появлением устойчивых к противомикробным препаратам бактерий, в том числе *Pseudomonas*. Потенциальной альтернативой традиционным мерам борьбы с бактериальными заболеваниями является применение бактериофагов [5]. Бактериофаги или фаги являются естественными врагами бактерий и могут успешно использоваться в качестве терапевтических или профилактических средств против бактериальных болезней растений [6].

В данной работе был охарактеризован бактериофаг *Pseudomonas* Pf-10, входящий в состав биопестицида «Мультифаг» [7]. Данный препарат состоит из шести *Pseudomonas* бактериофагов, включая фага Pf-10, и применяется на территории Белоруссии при бактериальных заболеваниях сельскохозяйственных культур, вызываемых *Pseudomonas syringae*. Фаг Pf-10 был выделен в 2014 г. Пилипчук Т.А. из образца ткани зеленой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), инфицированной *P. syringae pv. Syringae*. Фаг Pf-10 является первым фагом из препарата «Мультифага», который был секвенирован и подвергнут тщательному анализу, включая морфологический анализ с помощью просвечивающей электронной микроскопии, тест на стабильность, анализ генома (организация генома и стратегия упаковки генома), филогенетический анализ и определение параметров фаговой инфекции на хозяине *P. syringae* BIM B-268.

Согласно морфологическому анализу вирионов, фаг Pf-10 имеет морфотип подовируса. На газоне штамма-хозяина *P. syringae* BIM B-268 фаг Pf-10 формирует прозрачные бляшки диаметром примерно 4–8 мм с характерной небольшой зоной неполного лизиса. Морфологический анализ с помощью просвечивающей электронной микроскопии показал, что фаг Pf-10 имел икосаэдрический капсид диаметром примерно 55,5±2,8 нм и очень короткий несокращающийся хвост длиной примерно 11,2±0,8 нм. Фаг Pf-10 имеет типичные морфологические признаки морфотипа подовируса. Анализ стабильности показал, что Pf-10 является очень стабильным бактериофагом, который способен выживать при значениях pH от 5 до 10 и при температурах от 4 до 60 °C в течение 1 часа с сохранением своей литической активностью в отношении штаммов *Pseudomonas*. Была проведена оценка убивающей способности фага Pf-10 в условиях инфекции культуры *P. syringae* BIM B-268 при разных значениях множественности инфекции (MOI = 0,1; 1 и 10), а также оценено влияние ионов $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ на убивающую способность Pf-10.

Выявлено, что ингибирующее действие Pf-10 на рост бактерий значительно возрастает в зависимости от MOI, причем лизис бактериальных клеток идет наиболее эффективно без добавления солей $CaCl_2$ и $MgCl_2$, что, по всей видимости, связано с тем, что присутствие ионов $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ снижает убивающую способность фага. Отмечено, что инфекция клеток BIM B-268 при заражении фагом Pf-10 развивается достаточно быстро: лизис культуры даже при самом низком значении MOI наступает в течение 1 часа (в экспериментах без добавления солей $CaCl_2$ и $MgCl_2$).

Секвенирование и аннотация генома показали, что геном Pf-10 представляет собой линейную дц-ДНК с длиной 39 167 п.н. и GC-составом 56,5%. Геном содержит 49 генов, 32 из которых (65,3%) были функционально аннотированны с использованием BLASTp (NCBI) и HHpred. Кодируемые белки фага Pf-10 были разделены на несколько функциональных модулей, основными из которых являются: модуль упаковки и структуры/морфогенеза ДНК, литический модуль, модуль репликации и рекомбинации ДНК. Следует отметить, что расположение и структура модулей Pf-10 напоминают таковые в фаге *Enterobacteria* T7.

Модуль упаковки ДНК включает два белка: малую субъединицу терминазы (ORF45; идентификатор_протеина YP_009145640.1) большую субъединицу терминазы (ORF47; идентификатор_протеина YP_009145642.1). Решиающим этапом сборки фагов, принадлежащих к *Caudovirales*, является упаковка генома, выполняемая большой субъединицей терминазы. Чтобы предсказать тип концов генома и механизм упаковки фага Pf-10, аминокислотную последовательность белка большой субъединицы терминазы Pf-10 сравнивали с белками большой субъединицы терминазы из фагов с хорошо изученными механизмами упаковки ДНК. Выявлено, что упаковывающий белок фага Pf-10 наиболее близок к большой субъединицы терминазы фага PFP1, который осуществляет упаковку ДНК в капсид с короткими прямыми концевыми повторами на концах генома длиной 270 п.н. Рестрикционный аналаз ДНК фага Pf-10, подтвердил наличие на концах генома Pf-10 коротких повторов. Таким образом, филогенетический и рестрикционный анализы предполагают, что фаг Pf-10 использует механизм упаковки, основанный на T7-подобных коротких прямых концевых повторах, длина одного повтора в геноме фага составляет приблизительно 270 п.н.

Чтобы оценить филогенетическое родство фага Pf-10 с известными фагами, было построено вирусное протеомное дерево с помощью сервера ViPTree 1.9. Выявлено, что ближайшим родственником бактериофага Pf-10 является фаг *Pseudomonas* BIM BV-46, который, как и Pf-10, входит в состав биопестицида «Мультифаг». Согласно проведенному филогенетическому анализу бактериофаг Pf-10 является новым видом фага, принадлежащим к роду *Pifdecavirus* подсемейства *Studiervirinae*, семейства *Autographiviridae*, отряда *Caudovirales*.

Результаты исследования способствуют накоплению данных по биологии фагов, которые могут помочь в разработке наиболее эффективных комбинаций фагов в препаратах на основе бактериофагов для борьбы с болезнями растений, вызываемыми *Pseudomonas*.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-516-00015 и со-финансировании БРФФИ в рамках научного проекта № Б20Р-078.*

## Литература

1. *Balestra G.M.; Bovo M.* Effectiveness of Copper Compounds in the Control of Bacterial Diseases of Kiwifruit Plants. In Proceedings of the Acta Horticulturae; 2003; Vol. 610.

2. *la Torre A.; Iovino V.; Caradonia F.* Copper in Plant Protection: Current Situation and Prospects. Phytopathologia Mediterranea 2018, 57.
3. *Lamichhane J.R.; Osdaghi E.; Behlau F.; Köhl J.; Jones J.B.; Aubertot J.N.* Thirteen Decades of Antimicrobial Copper Compounds Applied in Agriculture. A Review. Agronomy for Sustainable Development 2018, 38.
4. *McManus P.S.; Stockwell V.O.; Sundin G.W.; Jones A.L.* Antibiotic Use in Plant Agriculture. Annual Review of Phytopathology 2002, 40.
5. *Buttimer C.; McAuliffe O.; Ross R.P.; Hill C.; O'Mahony J.; Coffey A.* Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. Frontiers in Microbiology 2017, 8.
6. *Frampton R.A.; Pitman A.R.; Fineran P.C.* Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. International Journal of Microbiology 2012.
7. *Pilipchuk T.A.; Gerasimovich A.D.; Ananieva I.N.; Kolomiets E.I.; Popov F.A.; Novik G.I.* Biopesticide "Multiphage" Based on Phages of Phytopathogenic Bacteria Pseudomonas Syringae and Pseudomonas Fluorescens Used in Agriculture to Control Plant Diseases. Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects 2015, Trudy 7th Int Conf, 197–219.

# Выделение и характеристика умеренного бактериофага B13, инфицирующего бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato*

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

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
лаборатория биологии вирусов бактерий, Пущино, Olesyakazantseva@bk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37896

Бактериофаги (фаги) – это вирусы, поражающие бактерии. Бактериофаги бывают вирулентными и умеренными: вирулентные фаги начинают репликацию и сборку вирионов вскоре после ввода своего генетического материала в клетку-хозяина (литический цикл), а умеренные фаги при попадании в клетку могут вступать или в литический, или в лизогенный цикл. В ходе лизогенного цикла ДНК фага интегрируется в геном хозяина (интегрированные профаги) или реплицируется в цитоплазме хозяина в форме кольцевой или линейной плазмиды (плазмидные профаги). Профаги могут сохраняться в популяции хозяина в течение длительного времени, а затем переключаться на литический цикл (индукция профага). Биологически активные профаги (то есть те, которые все еще индуцируются и способны продуцировать функциональные фаговые частицы) могут дегенерировать в неактивные остатки профага, неспособные обеспечить производство функциональных фаговых частиц из-за мутаций в ключевых генах [1].

В последнее десятилетие интерес к бактериофагам вновь возрос – поскольку фаги и их компоненты могут быть основой для разработки антибактериальных препаратов, систем диагностики и доставки лекарственных средств. Для максимально эффективного применения бактериофагов в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности требуется их глубокое изучение на генетическом уровне с помощью метода полногеномного секвенирования. Кроме того, необходим масштабный поиск новых бактериофагов – несмотря на то, что на данный момент описано уже 437 видов хвостатых дцДНК-содержащих бактериофагов, считается, что это лишь «вершина айсберга», и основную часть разнообразия бактериофагов еще предстоит открыть. Особенно интересны с точки зрения новизны умеренные бактериофаги, которые могут долгое время существовать в латентной форме (в состоянии профага), при этом лишь малая доля профагов индуцируется и лизирует хозяйскую клетку. Поэтому таких бактериофагов труднее обнаружить и изучать экспериментальными методами, и, следовательно, многие умеренные фаги даже таких хорошо изученных бактерий как *E. coli* и *B. cereus* еще не были описаны и таксономически классифицированы.

В данной работе мы описываем новый умеренный бактериофаг B13, инфицирующий бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato*.

Бактериофаг был выделен из штамма-хозяина *Bacillus cereus* B-13, полученного из Всероссийской коллекции микроорганизмов, методом индукции профагов митомицином. Для этого к культуре штамма-хозяина в экспоненциальной фазе роста добавляли раствор митомицина до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали культуру еще несколько часов до момента падения оптической плотности относительно контрольного образца (культуры штамма-хозяина без митомицина). Лизат центрифугировали и супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Полученый препарат бактериофага высевали на газон чувствительного штамма в нескольких разведениях, чтобы получить отдельные негативные колонии (бляшки). Отдельные негативные колонии переносили в лунки микропланшета с 500 мкл среды SM, по одной колонии на лунку, и инкубировали при температуре 4 °C и встряхивании в течение ночи для экстракции частиц бактериофага. Полученные экстракты высевали на газон чувствительного хозяина *Bacillus cereus* VKM B-370 для получения отдельных негативных колоний, и данный цикл титрования-экстракции повторяли 3 раза, чтобы отобрать морфологически однородные бляшки.

На газоне штамма B-370 бактериофаг B13 образовывал мутные бляшки с диаметром приблизительно равным 1 мм. В жидкой культуре, при заражении бактериофагом штамма B-370 в ранней экспоненциальной фазе роста при множественности инфекции (MOI) 0.01, частичный лизис культуры наблюдался через 250 минут после заражения, при MOI 0.1 – через 200 минут, при MOI 1 – через 170 минут и при MOI 10 – через 130 минут после заражения. После частичного падения плотности культуры наблюдалось ее постепенное нарастание, что может быть связано с образованием профагов B13 и приобретенной устойчивостью клеток-лизогенов к свободному фагу B13 (исключение суперинфекции).

ДНК фага секвенировали на платформе Illumina, сборку генома производили с помощью сервиса PATRIC и программного обеспечения SPAdes 3.11.1. Удалось собрать один кольцевой контиг, что свидетельствует о полноте сборки. Геном бактериофага имеет длину 36864 пн и содержит 53 гена, как было предсказано с помощью RASTtk. Функции 30 из 53 генов (57%) удалось установить. Функционально аннотированные структурные белки и белки, участвующие в сборке вириона включают: портальный белок (ORC3), протеазу прокапсида (ORC4), главный белок капсида (ORC5) и два белка завершения головки (7 и 8). Белки хвоста включают: белок завершения хвоста (ORC9), белок терминации хвоста (ORC10), белок хвостовой трубки (ORC11), шаперон сборки хвоста (ORC12), белок хвостовой рулетки (ORC14), дистальный хвостовой белок (ORC15) и белок хвостовой фибриллы (ORC16). Набор генов хвостовых белков B13 типичен для фагов с морфотипом сифовирусов (имеющих длинный несокращающийся гибкий хвост).

Белки литического модуля включают холин (ORC18) и эндолизин (N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза, ORC19). Модуль генов репликации относится к типу «Инициатор-соло» [2] и состоит из одного гена белка инициатора репликации (ORC38). Сорок восемь генов (91%) расположены на одной цепи, и пять – на противоположной. Среди последних – сайт-специфичная тирозиновая интеграза (ORC), рядом с которой обнаруживаются гены многочисленных транскрипционных регуляторов. Такая организация генома и набор белков типичны для умеренных бактериофагов, например, бактериофага лямбда и ранее описанного нами бактериофага B83 [3]. В геноме B13 не были обнаружены гены белков систем сегрегации плазмид, что указывает на то, что в ходе лизогенного цикла данный фаг интегрируется в геном хозяина, а не реплицируется в форме плазмиды, как делают некоторые другие умеренные бактериофаги [1].

При анализе генома B13 в программе PhageTerm [4] было предсказано, что бактериофаг использует headful стратегию упаковки ДНК. Это предположение было подтверждено экспериментально путем рестрикционного анализа геномной ДНК бактериофага с использованием эндонуклеаз рестрикции HindIII, BamHI, BglII и PstI. На электрофореграмме наблюдались паттерны, типичные для бактериофагов с сайт-специфичной headful упаковкой ДНК: присутствовали все фрагменты, предсказанные при разрезании кольцевой формы фаговой хромосомы указанными ферментами *in silico*, а также еще один дополнительный фрагмент, обнаруживающийся в субмолярных количествах (так называемый *pac*-фрагмент) [5].

Как было выявлено в ходе BLASTn выравнивания последовательности полного генома B13 против базы данных вирусов NCBI (taxid: 10239), B13 не имеет близких родственников из числа ранее описанных вирусов. Геном ближайшего родственника – сифовируса BMBtp1, заражающего *Bacillus*, всего лишь на 28% идентичен геному B13. В настоящий момент в официальной вирусной таксономии используют-

ся следующие критерии объединения вирусов в один таксон: ≥95% идентичности геномов – для объединения в один вид, ≥70% идентичности геномов и ≥40% общих белков – для объединения в один род. Следовательно, B13 принадлежит к новому, ранее не известному роду вирусов.

Таким образом, в данной работе был выделен и описан новый умеренный бактериофаг бацилл B13, интересный в первую очередь огромной генетической дистанцией, отделяющей его от всех известных науке вирусов. Низкая степень идентичности с ближайшими родственниками означает, что B13 может быть отнесен к новому таксону высокого ранга в фаговой таксономии – роду или даже семейству.

## Литература


1. *Piligrimova, Emma G., et al.* Putative plasmid prophages of Bacillus cereus sensu lato may hold the key to undiscovered phage diversity. Scientific reports 11.1 (2021): 1–16.
2. *Weigel C., Seitz H.* Bacteriophage replication modules // FEMS microbiology reviews. – 2006. – Т. 30. – №. 3. – С. 321–381.
3. *Piligrimova, Emma G., et al.* Bacillus phage vB_BtS_B83 previously designated as a plasmid may represent a new Siphoviridae genus. Viruses 11.7 (2019): 624.
4. *Garneau, Julian R., et al.* PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. Scientific reports 7.1 (2017): 1-10.
5. *Russell D.A.* Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes // Bacteriophages. – Humana Press, New York, NY, 2018. – С. 109–125.


# Гликополимеры клеточной стенки – хемотаксономический маркер актинобактерий рода Clavibacter


*Ким Д.[1], Тульская Е.М.[1], Потехина Н.В.[1], Дорофеева Л.В.[2], Евтушенко Л.И.[2]*

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, debora217@mail.ru

[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Всероссийская коллекция микроорганизмов)



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37897


Гликополимеры клеточных стенок, ковалентно связанные с пептидогликаном и расположенные на поверхности клетки, играют важную роль в различных жизненно важных процессах микробной клетки. Состав и структура гликополимеров и/или их структурных компонентов являются характерными для отдельных видов, групп видов, а также родов и высших таксонов актинобактерий [1]. Знания о составе и строении гликополимеров могут быть использованы для обоснования описания новых видов (дифференциация от известных на уровне фенотипа) и уточнения таксономического положения штаммов ранее описанных видов.

Актинобактерии рода *Clavibacter* (сем. *Microbacteriaceae*) – коринеформные бактерии, имеют пептидогликан клеточной стенки с 2,4-диаминомасляной кислотой (B2γ-тип) и преобладающий менахинон дыхательной цепи MK-9 [2]. Большинство видов рода являются возбудителями сосудистых заболеваний растений, поражают экономически важные сельскохозяйственные культуры. Три вида являются карантинными [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list] во многих странах мира. Род включает в настоящее время семь видов и четыре подвида [https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter]. Наряду с валидно описанными видами, выявлен ряд штаммов, которые являются претендентами на новые виды.

Цель исследования – сравнительное изучение и оценка таксономической значимости состава стеночных гликополимеров актинобактерий рода *Clavibacter*.

Объектом исследования были типовые штаммы фитопатогенных видов – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ВКМ Ac-1403$^T$, *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402$^T$ и *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404$^T$, поражающих томаты, люцерну и кукурузу, а также *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1374, выделенные из дикорастущих растений пустыни Кызылкум. Штаммы из пустынных растений имеют более 99% сходства последовательностей гена 16S рРНК между собой и с известными видами рода, но относятся, согласно таксогеномным показаталям (ANI и dDDH), к разным, пока не описанным видам [3].

Культуры получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, https://www.vkm.ru). Выращивание культур, получение клеточных стенок и препаратов гликополимеров клеточных стенок описано ранее [4]. Состав и структуры гликополимеров определяли химическими и ЯМР-спектроскопическими методами [4].

У всех 6 исследованных штаммов выявлен кислый полисахарид, пирувилированный галактоманнан, с повторяющейся единицей: →3)-α-D-Gal*p*-(1 → 3)-α-D-[4,6-*S*-Pyr]-Man*p*-(1 → 3)-α-D-Man*p*- (1→, частично ацетилированный (+AcOH, табл. 1) в разных пропорциях у штаммов ВКМ Ac-1372 и ВКМ Ac-1374.

Все штаммы содержали также в клеточной стенке нейтральный полисахарид – β-(1 → 6)-связанный галактофуранан, несущий боковые ди- и/или трисахариды. Галактофурананы изученных типовых штаммов фитопатогенных видов различались по локализации гликозидной связи и количеству моносахаридных остатков в боковом звене, в то время как полимеры изученных пустынных (сапрофитных) штаммов оказались идентичными (табл. 1).

*Таблица 1*

**Гликополимеры клеточных стенок изученных представителей различных видов рода *Clavibacter***

| Гликополимеры | Штаммы ВКМ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *C. insidiosus* Ac-1402$^T$ | *C. michiganensis* Ac-1403$^T$ | *C. nebraskensis* Ac-1404$^T$ | *Clavibacter* sp. Ac-1371 | *Clavibacter* sp. Ac-1372 | *Clavibacter* sp. Ac-1374 |
| Пирувилированный галактоманнан | ● | ● | ● | ● | ●+AcOH | ●+AcOH |
| Галактофуранан 1 | ● | | | | | |
| Галактофуранан 2 | | ● | | | | |
| Галактофуранан 3 | | | ● | | | |
| Галактофуранан 4 | | | | ● | ● | ● |

Полученные результаты в сочетании с таксогеномными данными и традиционными таксономическими характеристиками представляют интерес для развития системы классификации рода *Clavibacter* и разграничения на уровне фенотипа близкородственных фитопатогенных и сапрофитных видов *Clavibacter*.

## Литература


1. *Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Evtushenko L.I.* Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603$^T$, Biochemistry (Moscow) 2020, 369–377.
2. *Evtushenko L.I., Takeuchi M.* The family *Microbacteriaceae,* in: E.S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes, v. 3, 2006, pp. 1020–1098, Springer Science.
3. *Starodumova I., Prisyazhnaya N., Tarlachkov S., Dorofeeva L., Vasilenko O., Evtushenko L.* Taxonomy of the genus *Clavibacter*. In *XXXVII ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN CULTURE COLLECTIONS' ORGANISATION* (p. 107).
4. *Kim D., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M.* Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403$^T$, Carbohydr. Res. 500 (2021) 108247.1101403$^T$, Carbohydr. Res. 2021, 108, 247.

# Метаболический потенциал кишечного микробиома подростков с ожирением и нормальной массой тела

*Клименко Е.С., Белькова Н.Л., Романица А.И., Погодина А.В., Рычкова Л.В.*

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», klimenko.elizabet@gmai.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37898

Ожирение – это заболевание, развивающееся в результате сложного взаимодействия различных факторов. Одним из ключевых факторов является дисбиотическое состояние микробного сообщества кишечника. Целью настоящего исследования стало определение метаболических отличий кишечной микробиоты у детей с ожирением и нормальной массой тела.

## Материалы и методы

Объектами исследования были подростки в возрасте 11–17 лет, группы сформированы из числа подростков, направленных для обследования в Клинику ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (г. Иркутск). Описание групп, критери включения и исключения и способ обработки данных секвенирования были опубликованы ранее (Pogodina et al., 2017; Белькова и др., 2019; Григорова и др., 2020; Клименко и др., 2020; Belkova et al., 2020). Для прогнозирования функционального потенциала бактериального сообщества использовался пакет программ PICRUSt2 v2.4.1.

## Результаты исследования

В ходе работы нами было получено 40 ампликоновых библиотек. После первичной обработки результатов секвенирования библиотеки имели 64761,32±864,21 прочтений и 445,80±8,61 ASV. Значения индексов Chao1, Shannon и Faith PD в исследуемой группе подростков составило 449,23±8,78; 6,68±0,09 и 28,57±1,07 соответственно. Кишечная микробиота у подростков была представлена большим количеством видов, и обладала схожей выравненностью сообщества, но, согласно значениям индекса Faith PD, микробиомы некоторых подростков (D1, D4, D5, D46 – контрольная группа; D6, D7, D9, D26, D27 – основная группа) отличаются очень высоким филогенетическим разнообразием сообщества. Для оценки бета-разнообразия между микробиоценозами были выбраны критерии невзвешенный и взвешенный UniFrac. Согласно графику кластеризации невзвешенного UniFrac, все подростки формально делятся на четыре группы, причем исходное деление на основную и контрольную группы не оказывает влияния на кластеризацию образцов по составу микробиома. Первая группа образована из 26 образцов, формирующих на графике очень плотный кластер. Две других группы были образованы несколькими образцами, которые имели небольшие отличия в составе минорных компонентов микробиома по сравнению с первой группой. Четвертую группу сформировали подростки (D31 – контрольная группа; D6, D9, D26 – основная группа), чьи микробиомы показали значительные отличия от всей выборки и между собой, чьи образцы на графике ординации находились очень далеко от основной группы и друг от друга, что говорит об очень большой разнице в составе компонентов микробного сообщества кишечника. График взвешенного UniFrac показал, что существенной разницы в частоте представителей «корового» микробиома не наблюдалось.

В кишечном микробиоме подростков доминировали представители филумов Bacteroidetes (46,35±1,88%), Firmicutes (43,17±2,14%), Proteobacteria (7,45±0,83%) и Actinobacteria (1,9±0,57%). Филум Bacteroidetes был представлен, в основном, такими родами, как *Bacteroides, Prevotella* и *Alistipes*, которые являются доминантными членами бактериального сообщества кишечника. Для Firmicutes было характерно наличие *Dialister* и таксономических групп Ruminococcaceae UCG-002 и [Eubacterium] coprostanoligenes. Из филума Proteobacteria присутствовали *Sutterella*, *Serratia* и таксономическая группа *Escherichia-Shigella*, а среди актинобактерий наблюдались представители *Bifidobacterium* и *Collinsella*.

Для исследуемого микробного сообщества была предсказана высокая метаболическая активность в отношении биосинтеза аминокислот, нуклеозидов и нуклеотидов, витаминов и кофакторов, а также ли-

пидов и жирных кислот. Потенциально наиболее активными считались пентозофосфатный путь, путь биосинтеза гондоиновой кислоты, путь деградации крахмала и ферментация пирувата до изобутанола. Исходя из распределения обилия потенциальной активности предсказанных метаболических путей, выборка исследуемых подростков разделилась на две группы. Для первой группы (D28, D36, D41, D42, D47 – контрольная; D7, D9, D15, D20, D26, D27 – основная) предсказан более интенсивный метаболизм в путях биосинтеза нуклеотидов, нуклеозидов и аминокислот, чем во второй.

Ни одно из разделений на группы не зависело от принадлежности подростка к основной или контрольной выборке. Это говорит о том, что нет четкой зависимости между наличием/отсутствием в кишечном сообществе определенных видов бактерий и ожирением. Деление на группы по предсказанным метаболическим функциям показало, что даже при наличии разницы в таксономическом составе, кишечное сообщество может компенсировать отсутсвие тех или иных таксономических групп, реализуя необходимые метаболические функции за счет иных таксонов.

## Литература


1. *Pogodina A., Rychkova L., Kravtzova O., Klimkina J., Kosovtzeva A.* Cardiometabolic Risk Factors and Health-Related Quality of Life in Adolescents with Obesity // Childhood obesity. 2017. Vol. 13, N. 6. P. 499–506. doi:10.1089/chi.2016.0330
2. *Белькова Н.Л., Немченко У.М., Погодина А.В., Феранчук С.И., Романица А.И., Новикова Е.А., Рычкова Л.В.* Особенности состава и структуры кишечного микробиома подростков с ожирением и разной продолжительностью грудного вскармливания // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167, № 6. С. 717–721.
3. *Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Клименко Е.С., Погодина А.В., Романица А.И., Новикова Е.А., Рычкова Л.В.* Метасеквенирование V3-V4 вариабельных районов гена 16S рРНК условно-патогенной микробиоты и биоценоз толстой кишки у подростков с ожирением // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170, № 9. С. 312-317. doi:10.47056/0365-9615-2020-170-9-312-317
4. *Клименко Е.С., Погодина А.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л.* Возможность таксономической идентификации бифидобактерий на основании различных вариабельных районов гена 16S рРНК // Генетика. 2020. Т. 56, № 8. С. 904-914. doi:10.31857/S001667582008007X
5. *Belkova N., Klimenko E., Romanitsa A., Pogodina A., Rychkova L.* Metagenomic 16S rDNA amplicon datasets from adolescents with normal weight, obesity, and obesity with irritable bowel syndrome from Eastern Siberia, Russia // Data Brief. 2020. Vol. 6, N. 32. P.106141. doi:10.1016/j.dib.2020.106141


# Разнообразие прокариотных сообществ аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов под тропическим лесом (заповедник Пу Хоат, Вьетнам)


*Князева А.В.[1,2], Лысак Л.В.[1]*

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения
[2] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
aknyazeva1999@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37899


Важной проблемой микробной экологии является изучение разнообразия микроорганизмов в ненарушенных природных биогеоценозах в связи с постоянно усиливающейся антропогенной нагрузкой на биосферу нашей планеты. Наиболее разнообразными и, в тоже время, наименее изученными территориями являются тропические и субтропические леса Америки и Юго-Восточной Азии. На территории Вьетнама в настоящее время располагаются национальные парки, почвы которых находятся под минимальным антропогенным воздействием. Микробиологические исследования в этом регионе практиче-

ски не проводились. Комплексное исследование обилия и разнообразия микробных сообществ особо охраняемых природных территорий (ООПТ) Вьетнама представляется весьма актуальным.

Аллювиальные почвы широко распространены на территории Вьетнама и характеризуются высоким плодородием. Значительная часть их распахана и занята сельскохозяйственными культурами. Только небольшая доля аллювиальных почв расположена на территории заповедников и находится под дикой растительностью. Изучение структуры и функционала микробных сообществ ненарушенных почв необходимо для понимания направленности микробиологических процессов, происходящих в почвах.

Целью нашей работы было проведение комплексное исследование разнообразия прокариотных сообществ аллювиальной бурой почвы под тропическим лесом и сопряженных субстратов на территории заповедника Пу Хоат. Ранее подобные исследования не проводились.

Аллювиальная бурая почва сформирована на гранитах (Skeletic Dystric Fluvisol Humic, WRB) и расположена под тропическим широколиственным полидоминантным высокоствольным лесом. Изучали микробные сообщества почвенных горизонтов (А 0–15 см и АВ 15–25 см), лиственного опада и уникального локуса тропического леса – «подвешенной почвы» из корзинок эпифитных папоротников, развивающихся на стволах древесной растительности. Эпифитные папоротники «корзиночного» типа накапливают значительное количество (до 40 кг) массы органического и органоминерального субстрата.

Общая численность бактерий (прямой люминесцентный метод) незначительно колебалась в исследованных фитоценотических горизонтах, максимальные значения зафиксированы в образцах «подвешенной почвы» (2,21 млрд клеток/г) и растительного опада (2,1 млрд клеток/г), а минимальные в горизонте АВ (1,05 млрд клеток/г). Показатели длины актиномицетного мицелия максимальны в образцах растительного опада (800 м/г), ниже в «подвешенной почве» (590 м/г), что сравнимо или даже превышает аналогичные показатели для зональных почв (красно-желтая гумусно-ферраллитная и ферраллитная почвы). Длина грибного мицелия значительно варьировала между образцами, и изменялась от 30 до 960 м, при этом наблюдалось резкое снижение этого показателя вниз по профилю. Эти показатели значительно ниже, чем обычно фиксируются в лесах умеренного пояса. Максимальные показатели длины грибного мицелия выявлены в образцах опада. что указывает на активную роль грибов в разложении растительных остатков, поступающих на поверхность почвы. Выявленная закономерность отличает исследованные почвы лесов Вьетнама от почв лесов умеренного пояса, где максимальные показатели длины грибного мицелия обычно фиксируются в подстилке. В фитоценозах, развивающихся на аллювиальной бурой почве, наблюдалось снижение бактериальной биомассы вниз по профилю, причем максимум был приурочен к «подвешенной почве» (0,052 мг/г почвы).

Максимальная численность культивируемых сапротрофных бактерий (глюкозо-пептонно-дрожжевая среда) наблюдалась в образцах опада (1,33 млн КОЕ/г), минимальная в горизонте АВ (0,091 млн КОЕ/г). В горизонтах А и АВ, а также в образцах опада и «подвешенной почвы» доминируют бактерии родов *Streptomyces* и *Myxococcus*, что указывает на их значительный вклад в деструкцию растительного материала. В горизонте А почвы кодоминантами были представители рода *Bacillus*, в качестве минорных компонентов выступали представители родов *Promicromonospora*, *Arthrobacter*, *Cytophaga* и протеобактерии. В горизонте АВ обнаруживались, в основном, роды *Myxococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*. В опаде и «подвешенной почве» при доминировании актинобактерий (роды *Streptomyces*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*) в значительных количествах присутствовали протеобактерии родов *Myxococcus*, *Polyangium* и семейства Enterobacteriaceae, а также рода *Cytophaga*.

Проведенный метагеномный анализ (пиросеквенирование гена 16S рРНК) прокариотного сообщества почвы, опада и «подвешенной почвы» выявил доминирование в них филума Proteobacteria, ниже было содержание филумов Cloroflexi, Firmicutes, Actinobacteria и Acidobacteria, однако, их процентное соотношение значительно варьировало в исследованных субстратах. Также обнаружены филумы Verrucomicrobia, Nitrospirae, Planctomycetes и Gemmatimonadetes и некоторые другие. В почве (гор. А) наряду с протеобактериями, в значительных количествах присутствовали филумы Cloroflexi (18%), Firmicutes (16%), Acidobacteria (12%) и Actinobacteria (9%). В опаде доминировал филум Proteobacteria (70%), значительно ниже содержание филумов Acidobacteria (7%) и Actinobacteria (7%). В «подвешенной почве» также доминировали протеобактерии (49%), ниже содержание филумов Acidobacteria (19%) и Actinobacteria (11%). По представленности и соотношению таксонов «подвешенная почва» занимала промежуточное положение между образцами почвы и опада. Также в образцах почвы и «подвешенной почвы» были обнаружены представители домена Archaea, представленные филумами Thaumarchaeota,

Euryarchaeota. На основании данных по числу OTE были рассчитаны некоторые экологические показатели. Наибольшие показатели альфа разнообразия (коэффициент Шеннона) выявлены в образцах «подвешенной почвы». Прокариотное сообщество «подвешенной почвы» ближе к сообществу органоминерального горизонта почвы, чем к сообществу опада. Данный вывод подтверждается мерами сходства по метрикам Брея-Кертиса (0,41) и weighted UniFrac (0,39).

Итак, для прокариотных сообществ аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов характерна высокая представленность в них стрептомицетов, что свидетельствует о высоком вкладе их в деструкцию растительного материала, наряду с грибами. Высокое биологическое разнообразие прокариотного сообщества «подвешенной почвы» ставит этот локус в число перспективных для выделения штаммов бактерий, представляющих интерес для биотехнологии.

## Выявление гидролитических ферментов *Vibrio cholerae* и *Francisella tularensis* в субстратном электрофорезе

*Козлов С.Н., Николаев В.Б., Корнева А.В., Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.*

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, г. Иркутск, ejimei@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37900

Гидролазы (ЕС 3) представляют собой один из классов ферментов, осуществляющих биохимические реакции расщепления молекул биополимеров (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) до соответствующих мономеров при участии молекул воды [1], они обнаружены у всех живых организмов, включая бактерии. В последнее время интерес к бактериальным гидролитическим ферментам со стороны исследователей значительно возрос в связи с уже доказанной их ролью у многих патогенов в процессах метаболизма, споруляции, генерации межклеточных сигналов – запуску так называемой системы «Quorum sensing», приводящей к образованию биоплёнок в ответ на изменение среды, активации систем секреции, запуску каскадных механизмов процессов фибринолиза и протеолиза при проникновении в организм-хозяина и действии на клетки-мишени [2].

У *Vibrio cholerae* обнаружено и охарактеризовано несколько протеаз [3], у *Francisella tularensis* имеются сообщения о наличии липолитической активности [4], выявлении мембрансвязанных протеаз [5], детекции вирулент-ассоциированной сериновой гидролазы [6]. Однако на настоящий момент времени отсутствует в литературе полная информация о всех имеющихся гидролитических ферментах *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп и *F. tularensis* разных подвидов, нет их сравнительной характеристики и группировки по связи с патогенностью/вирулентностью и адаптацией/персистенцией штаммов этих микроорганизмов в связи с весьма вероятной ролью ферментов в этих процессах. Всё это определяет важность изучения гидролаз как дополнительных факторов патогенности, персистенции и адаптации у таких представителей ООИ как *V. cholerae* и *F. tularensis* разной эпидемической значимости и происхождения.

Одним из высокочувствительных, высокоспецифичных, хорошо воспроизводимых и наглядных методик обнаружения и полуколичественного анализа продуктов гидролиза гидролитических ферментов является прямая зимография в полиакриламидном геле [7].

В связи с чем она была выбрана ввиду её конкурентных преимуществ по сравнению с другими энзимологическими методами – она позволяет наглядно и в течение короткого времени определить состав, спектр и свойства, оценить мол. массу обнаруженных гидролитических ферментов, относящихся к разным подклассам.

Основной задачей работы явилось выявление наличия, состава и сравнительное изучение некоторых свойств гидролитических ферментов разных подклассов у *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп и *F. tularensis* разных подвидов.

Объектами для исследования стали препараты субклеточных фракций *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп и *F. tularensis* разных подвидов, супернатанты культуральной жидкости холерного вибриона (выборка n = 40). Субклеточные фракции холерных вибрионов и туляремийного микроба получали по методу [8]. Супернатанты культуральной жидкости получали из бакмассы *V. cholerae,* выращенной в течение суток на МПБ при 37 °С при pH 7,8 и помещённой во флаконы с МПБ. После двухчасовой инкубации во флаконы с МПБ добавляли мертиолят натрия в концентрации 0,01% и инкубировали в течение двух суток на холоду. После прохождения контроля специфической стерильности материал центрифугировали, супернатант диализовали и лиофилизировали. Зимографию осуществляли электрофорезом в 8% ПААГ, сополимеризованном с желатином, казеином, человеческим IgG, фибрином, муцином, пептидогликаном, карбоксиметилцеллюлозой, коллоидным хитином и гликольхитозаном, импрегнированных в полиакриламидный гель в 0,1% конечной концентрации. О наличии активности ферментов судили по образованию бесцветных полос на фоне окрашенных Coomassie R-250, Amidoblack 10B, Alcian Blue полиакриламидных гелей.

Достоверно установлено, что большинство препаратов субклеточных фракций *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп и *F. tularensis* разных подвидов имеет в своём составе полипептиды, обладающие протеазной, казеиназной, IgG-деградирующей, фибринолитической, муциназной, нуклеазной, пептидогликангидролазной, липолитической, лецитиназной, карбоксиметилцеллюлазной и хитинолитической активностями. При этом отмечены различия в продукции тех или иных гидролаз в зависимости от эпидзначимости исходных штаммов: у нетоксигенных водных штаммов *V. cholerae* больше экстрацеллюлярных протеаз (восемь протеаз), семь IgG-протеаз, шесть карбоксиметилцеллюлаз, хитиназ (девять хитиназ), лежащих в высоко и средне молекулярных (от 120 до 60 кДа) зонах геля, у препаратов субклеточных фракций холерного вибриона обнаружено пять хитозаназ, в то время как у препаратов из токсигенных штаммов наблюдается большее количество муциназ (шесть), семь РНКаз, три лецитиназы с мол. массой 80, 90 и 120 кДа, восемь липаз, а у нетоксигенных от одной до двух липаз в зависимости от штамма. У препаратов субклеточных фракций туляремийного микроба больше всего протеаз и карбоксиметилцеллюлаз обнаруживается у авирулентных штаммов, в то время как у вирулентных преобладает количество хитиназ (семь), липаз (четыре) с мол. массами 50, 70, 90, и 110 кДа, фибринолитических протеаз (пять), и IgG-протеаз, с мол. массами 65, 75, 80 и 120 кДа. Обнаруженная высокая активность протеаз, хитиназ и пептидогликангидролаз у нетоксигенных штаммов *V. cholerae* свидетельствует об их вкладе в адаптационный (персистентный) потенциал этих штаммов, более высокая активность муциназ, липаз, лецитиназ, РНКаз у токсигенных может указывать на их роль в патогенности возбудителя. Более высокая продукция протеаз и карбоксиметилцеллюлаз у авирулентных *F. tularensis* может указывать на их роль в адаптации, и соответственно преобладание хитиназ, липаз IgG-протеаз у вирулентных свидетельствует об их возможной роли в патогенезе туляремийной инфекции.

Таким образом, с помощью субстратного электрофореза в ПААГ выявлены достоверные количественные и качественные различия в спектре бактериальных гидролитических ферментов, относящихся к разным подклассам у разных по патогенности (вирулентности) штаммам. Это предоставляет возможность косвенно оценивать их адаптационный и патогенный потенциалы, что определяет дальнейшие перспективы этого метода для микробиологической диагностики этих инфекций.

## Литература


1. *Robinson P.K.* Enzymes: principles and biotechnological applications (2015) Essays Biochem., 59, 1–41.
2. *Guilhen C., Forestier C., Balestrino D.* Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties (2017) Mol. Biol., 105(2), 188–210.
3. *Miyoshi, S.* Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio species* (2013) Front. Microbiol. 4, Article 339. 1–8.
4. *Рыкова В.И., Домарадский И.В.* Липолитическая активность некоторых патогенных микробов (1963) ЖМЭИ., 40, 14-17.
5. *Корнева А.В., Николаев В.Б., Козлов С.Н. и др.* Выявление мембрансвязанных протеаз *Francisella tularensis* (2016) Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 1(5), 133–139.
6. *Farberg A.M., Hart W.K., Johnson R.J.* The unusual substrate specificity of a virulence associated serine hydrolases from highly toxic bacterium, *Francisella tularensis* (2016) Biochem. Biophys. Rep., 7, 415–422.

7. *Vandooren J., Geurts N., Martens P.E. et al.* Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes (2013) Nat. Methods, 10(3), 211–220.
8. *Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П., Чернов А.Б. и др*. Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины (1995) Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол, 2 (Приложение), С. 86–89.

# Антибактериальные эффекты лантибиотиков в отношении представителей рода *Listeria*

*Коробов В.П.[1], Полюдова Т.В.[1], Суздальцева А.В.[1], Борзенков В.Н.[2], Аринбасарова А.Ю.[3], Меденцев А.Г.[3]*

[1] «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, korobov@iegm.ru
[2] Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл.
[3] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37901

Бактерии рода *Listeria* широко распространены в природе и часто являются контаминантами пищевых продуктов животного и растительного происхождения, употребление которых в пищу представляет высокий риск развития опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время насчитывается 21 вид рода *Listeria*, включая два патогенных для млекопитающих вида *L. ivanovii* и *L. monocytogenes*. Прочие виды листерий не обладают факторами патогенности и могут использоваться как модельные бактерии для изучения противомикробных соединений и выработки стратегий в отношении патогенных видов [1].

Целью настоящей работы явилось изучение профиля антибиотикорезистентности бактерий ряда видов рода *Listeria* и их чувствительности к антибактериальным катионным пептидам семейства лантибиотиков.

В работе исследованы бактерии *Listeria grayi* МКМ-1 (мясо-костная мука, 2010 г.), *L. innocua* М-4 (мышь, 2010), *L. seeligeri* АТСС 35967 (почва, 2001 г.) и *L. welshimeri* Bel-19 (мясные полуфабрикаты, 2020 г.), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (номера доступа В-7384, В-6643, В-7767 и В-4799, соответственно).

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом с использованием питательного агара Muller Hinton (МН) (HiMedia, Индия) и стандартных бумажных дисков с антибиотиками (НИЦФ, Россия). Для определения минимальных подавляющих и бактерицидных концентраций (МПК и МБК) готовили растворы лантибиотиков варнерина [2], хоминина [3] и низина (Sigma-Aldrich, США) в бульоне МН с концентрацией 1 мг/мл. Чувствительность бактерий к лантибиотикам определяли методом последовательных двукратных разведений в полистироловых планшетах в жидкой среде МН. Для определения МБК из лунок, в которых через 24 ч инкубации не наблюдался рост бактерий, удаляли содержимое и заполняли их стерильной питательной средой МН. Планшеты вновь инкубировали не менее 24 ч. Концентрация раствора лантибиотика, при удалении которого рост бактерий в свежей среде не возобновлялся, принималась за МБК.

Бактерии изученных штаммов листерий отличались высокой чувствительностью к большей части исследованных антибиотиков (табл. 1). В то же время, бактерии *L. grayi* МКМ-1 обладали резистентностью к меропенему и эритромицину, согласно критериям интерпретации результатов определения чувствительности *L. monocytogenes* [4]. Бактериии *L. innocua* М-2 обладали устойчивостью к цефтриаксону, а *L. seeligeri* АТСС 35967 были резистентны сразу к четырём антибиотикам: ампициллину, ме-

ропенему, цефтриаксону и эритромицину. Бактерии *L. welshimeri* Bel-19 также были полирезистентны и обладали устойчивостью к меропенему, комплексному препарату триметаприм/сульфаметоксазолу и к эритромицину [4]. Для подавления развития антибиотикорезистентных бактерий перспективными соединениями являются бактериоцины класса лантибиотиков. Наиболее известный представитель лантибиотиков низин эффективно используется в качестве консерванта пищевых продуктов на протяжении нескольких десятков лет.

*Таблица 1*

**Чувствительность листерий к антибиотикам, мм**

| Антибиотики | *L. grayi* МКМ-1 | *L. innocua* М-2 | *L. seeligeri* АТСС 35967 | *L. welshimeri* Bel-19 |
|---|---|---|---|---|
| Ампициллин | 21 | 21 | 0 | 24 |
| Ванкомицин | 20 | 21 | 24 | 18 |
| Гентамицин | 21 | 30 | 30 | 20 |
| Доксициклин | 22 | 28 | 30 | 25 |
| Левомицетин | 20 | 21 | 24 | 20 |
| Меропенемом | 0 | 29 | 0 | 0 |
| Триметоприм/Сульфаметоксазол | 30 | 30 | 32 | 24 |
| Цефтриаксон | 21 | 10 | 0 | 17 |
| Ципрофлоксацин | 31 | 20 | 21 | 25 |
| Эритромицин | 20 | 25 | 0 | 21 |

Проведенные нами исследования показали, что лантибиотики – стафилококкцины варнерин и хоминин обладают выраженной ингибирующей активностью в отношении *L. grayi* МКМ-1 и *L. seeligeri* АТСС 35967. Бактерии *L. innocua* М-2 были резистентны к хоминину, а *L. welschimeri* Bel-19 обладали устойчивостью к обоим стафилококцинам. Все изученные представители листерий обладали высокой чувствительностью к низину, значения МПК и МБК которого не превышали 16 мг/л.

*Таблица 2*

**Минимальная подавляющая (МПК) и бактерицидная (МБК) концентрации лантибиотиков для представителей рода *Listeria*, мг/л**

| Питательная среда | Варнерин | | Хоминин | | Низин | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | МПК | МБК | МПК | МБК | МПК | МБК |
| *L. grayi* МКМ-1 | 16 | 256 | 16 | 256 | 8 | 8 |
| *L. innocua* М-2 | 128 | >1000 | >1000 | >1000 | 16 | 16 |
| *L. seeligeri* АТСС 35967 | 2 | 32 | 8 | 64 | 4 | 8 |
| *L. welschimeri* Bel-19 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | 16 | 16 |

Таким образом, развитие полирезистентных представителей рода *Listeria* может быть подавлено внесением в среду их роста лантибиотиков низина и варнерина. Эффективность варнерина и хоминина может проявляться при их совместном применении с клиническими антибиотиками, хелатирующими агентами или в сочетании с другими физико-химическими факторами, как это было показано на бактериях *E. coli* [5].

## Литература


1. *Mohan V., Wibisono R., de Hoop L., Summers G., Fletcher G.C.* Identifying Suitable *Listeria innocua* Strains as Surrogates for *Listeria monocytogenes* for Horticultural Products // Front Microbiol. 2019. V. 10. P. 2281.
2. *Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К.* Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков// Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 228–238.

3. Патент РФ № 2528055 Антибактериальный пептид хоминин klp-1 широкого спектра действия. В.П. Коробов, Л.М. Лемкина, Т.В. Полюдова.
4. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». 2015 г.
5. *Polyudova T., Eroshenko D., Korobov V.* The effect of sucrose-induced osmotic stress on the sensitivity of *Escherichia coli* to bacteriocins // Canadian Journal of Microbiology. 2019. V. 65. P. 895–903.

## Изменение азотфиксирующей активности ризобий в клубеньках в зависимости от стадии вегетации растения-хозяина

*Коряков И.С., Акимова Е.С., Владимирова А.А., Баймиев Ан. Х.*

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, koryakov_igor@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37902

Взаимодействие партнеров в бобово-ризобиальном симбиозе происходит по сложному многостадийному пути, в котором активное участие принимают как растительные, так и бактериальные компоненты (Franche, 2009). Основным генетическим компонентом в данном взаимоотношении являются симбиотические гены (*sym*-гены) бактерий, которые определяют во многом специфичность и эффективность бобово-ризобиального симбиоза. Бобовые растения умеренного климата, в основном многолетние, в ходе своего онтогенеза проходят многократные циклы взаимодействия с клубеньковыми бактериями, где немаловажную роль играет сезонная цикличность, при которой происходят стадии образования и отмирания клубеньков (Проворов, Воробьев, 2012). Предполагается, что специфичность и эффективность данного симбиоза в разные фазы вегетации отличается. Так, в начале вегетационного периода, когда идет активный рост растения-хозяина, макросимбионт в большей степени взаимодействует с эффективными штаммами ризобий. В конце же вегетации, когда трофические связи ослаблены и нет потребности в минеральном азоте, клубеньки формируются преимущественно не эффективными штаммами, а *sym*-положительными микроорганизмами, где филогения самих бактерий уже не играет определяющей роли. Выяснение данных механизмов является важным условием при создании высокоэффективных симбиозов для растениеводства.

Целью данной работы стало исследование специфичности и азотфиксирующей активности ризобий в клубеньках, полученных на разных стадиях вегетации растения-хозяина. В качестве растительного объекта был выбран Лядвенец жигулёвский (*Lotus zhegulensis*), являющийся дикорастущим многолетним бобовым растением. Клубеньки с его корней собирали в течение 2 периодов вегетации: ранней весной – на стадии набухания почек, затем летом – на этапе появления бутонов и поздней осенью – с началом заморозков. Из полученных клубеньков в дальнейшем выделяли ризобии и проводили анализ их генетического разнообразия методом RAPD с использованием нескольких произвольных праймеров. Микроорганизмы с идентичными RAPD-профилями объединяли в гомогенные группы, из которых в дальнейшем в работу брали только по одному образцу. Далее определяли филогенетическое положение отобранных бактерий с помощью секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов консервативных генов: 16SрРНК и *recA*. Также были секвенированы последовательности *sym*-генов (*nifH* и *nodC*), кодирующих коровые части молекул, активно участвующих в становлении азотфиксирующего симбиоза.

Всего в ходе работы было проанализировано 295 микроорганизмов, полученных из клубеньков Лядвенца жигулёвского. Из них по итогам генетического анализа было отобрано 13 образцов для дальнейших исследований ростстимулирующей и азотфиксирующей активностей. Для этого поверхностно стерилизованные семена лядвенца инокулировали отобранными штаммами и выращивали их в стерильных условиях с искусственным освещением в течение месяца. Полученные растения были описаны, была

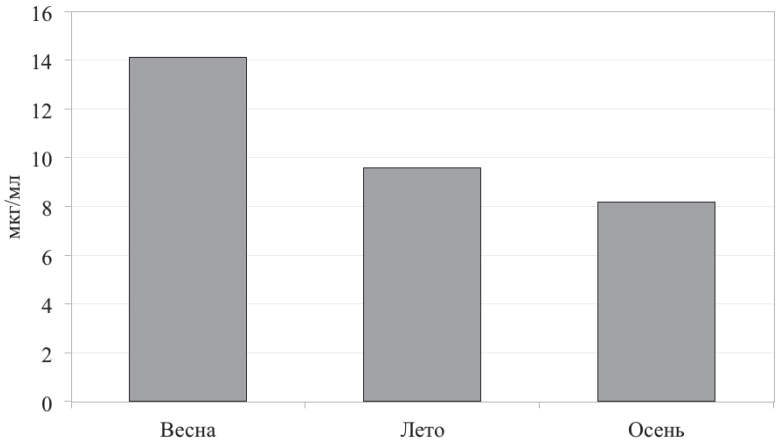



**Рис. 1.** Диаграмма анализа азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий в зависимости от сезона их получения

измерена их общая длина и длина корней и определена величина азотфиксирующей активности ацетиленредуцирующим методом в газовом хроматографе. В результате, выяснено, что «весенние» штаммы оказывают более сильное положительное влияние на рост и фиксацию азота растением нежели «летние» или «осенние» образцы на 4,52 мкг/мл и 5,92 мкг/мл соответственно (рис. 1). Это может говорить о том, что специфичность отбора весной больше направлена на образование более эффективного симбиоза по сравнению с летом и осенью, так как на начало вегетационного периода приходится основная часть роста растения, потребления азота и эффективность роста напрямую зависит от эффективноости азотфиксации и экзогормональной стимуляции клубеньковыми бактериями.

Таким образом, результаты опыта подтверждают гипотезу о более строгой специфичности отбора растением-хозяином эффективного варианта микросимбионта в начале вегетации, так как в это время происходит активный рост растения. Осенью же бобовые перед наступлением зимы образуют клубеньки с микроорганизмами, обладающими необходимыми для образования клубеньков генами и размножая их увеличивают в своей ризосфере пул микроорганизмов-доноров с подходящими для данного растения симбиотическими генами, которые через горизонтальный перенос генов могут участвовать в образовании наиболее эффективных штаммов клубеньковых бактерий.

## Литература

1. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И.* Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза // СПб.: Информ-Навигатор. – 2012. – С. 400.
2. *Franche C., Lindström K., Elmerich C.* Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants // Plant Soil. 2009. V. 321. P. 35–59.

# Изучение микробных сообществ хемоземов озера Атаманское Ростовской области

*Кочаровская Ю.Н.[1,2], Делеган Я.А.[2], Минкина Т.М.[3], Дудникова Т.С.[3], Сушкова С.Н.[3]*

[1] ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт, kocharovskayaj@mail.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[3] Южный Федеральный университет

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37903

Большинство микроорганизмов не культивируется в лабораторных условиях, поэтому изучение их биогеохимических и экологических функций невозможно обычными методами микробиологии. В ок-

ружающей среде они живут сообществами, в которых проявляют больший спектр функций по сравнению с ростом в виде чистой культуры. В настоящее время приоритетным методом исследования микробного разнообразия является метагеномика, которая включает в себя анализ суммарного генетического материала, выделяемого из целой биологической системы. В данной работе мы использовали shotgun-секвенирование, которое позволило нам комплексно изучить микробные сообщества (таксономический профиль и функциональный потенциал).

Для исследования были выбраны две точки (57 и 74) на территории озера Атаманское (Ростовская область) с самым высоким уровнем антропогенного загрязнения. Озеро Атаманское многие годы являлось резервуаром для жидких отходов химического предприятия. В связи с этим целью работы было изучить влияние на микробные сообщества загрязнений тяжелыми металлами и ПАУ импактной зоны озера.

Ранее были изучены химические и физические свойства почв. Техногенно-преобразованные почвы импактной зоны представлены хемоземами, сформировавшимися в русле озера. Образец 57 характеризуется нейтральной реакцией среды, а 74 – слабокислой, также в обеих пробах отмечено высокое содержание органического вещества. Отобранные образцы характеризуются чрезвычайно опасным уровнем загрязнения лабильными формами тяжелых металлов (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Cd) и ПАУ по эколого-геохимическим показателям. Наибольшей активностью обладают Zn и Cr, что обусловлено их повышенным содержанием в материнских породах. Валовое содержание Cu превышает кларковое значение в 40 раз. Установлено аномально высокое накопление Cd. В среднем, суммарное содержание ПАУ превышает глобальный фон в 20 раз в хемоземах озера Атаманское. Среди ПАУ отмечено доминирование 5-ти и 6-ти кольчатых соединений.

Shotgun-секвенирование проводилось на NextSeq500 с помощью набора NEBNext Ultra II DNA library prep kit (NEB) по стандартному протоколу. Прочтения, соответствующие человеческой ДНК, удаляли, используя программу BMTagger (Rotmistrovsky, Agarwala, 2011). Фильтрацию адаптерных последовательностей, низкокачественных и коротких прочтений проводили с помощью программы Trimmomatic (Bolger, 2014). Сборку геномов из прочтений осуществляли с использованием ПО SPAdes (Nurk, 2013). Аннотацию была проведена с помощью сервиса MG-RAST (Meyer, 2008) с помощью баз данных RefSeq, Silva, KEGG и т.д.

После сборки прочтений количество анализируемых последовательностей составило 18990 (57 образец) и 27353 (74 образец) – это количество контигов с длиной больше 500 bp в образцах. Длина первого контига в 57 образце составила 195159 bp, а в 74 – 171485 bp. Их аннотация позволила около 90% белковым кодирующим последовательностям назначить существующие функции.

Сообщества бактериальных организмов оценивали по автоматическому таксономическому диагнозу. Выявлено, что объем изучаемых выборок достаточный для проведения анализа, а также наблюдается тенденция к выравненности таксономического разнообразия в сообществах. Найдены доминирующие типы бактерий и архей. Среди бактерий доминируют типы *Actinobacteria* и *Proteobacteria* в обоих образцах, а *Firmicutes* и *Acidobacteria* в 57 и 74 соответственно. Они являются типичными почвенными микроорганизмами. Доминирование актинобактерий связано с их повышенной устойчивостью к низкому содержанию влаги в среде, которое обусловлено длительным засушливым периодом на территории. *Proteobacteria* типичны для нарушенных местообитаний, а вот распределение *Firmicutes* и *Acidobacteria* обусловлено реакцией среды. Среди архей явно доминируют представители типа *Euryarchaeota*. Их доминирование связано с участием этих микроорганизмов в почвенных круговоротах веществ. Оценка бета-разнообразия указала на то, что образцы обладают большим количеством уникальных видов, и, следовательно, структура сообществ неидентична.

Также мы изучили глобальный метаболизм почвенных сообществ в целом. Отмечено, что большинство известных метаболических путей присутствует в обоих образцах. Осуществлен поиск и оценка таксономического разнообразия генов, вовлечённых в катаболизм ПАУ. В 57 образце было найдено 3640, в 74 – 3615 прочтений, соответствующих генам катаболизма ПАУ. Обнаруженные гены вовлечены в катаболизм ПАУ у микроорганизмов различных таксономических категорий. Ожидаемо были обнаружены прочтения, соответствующие указанным генам актинобактерий и псевдомонад, также большая доля прочтений генов катаболизма ПАУ соответствовала бактериям *Azoarcus*, *Variovorax*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*. С помощью KEGG KO Mapper были выявлены метаболические пути, в которых принимают участие гены катаболизма ПАУ в исследуемых образцах. Из известных 5 путей были обнаружены два: 1) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation – деструкция полициклических аро-

матических углеводородов (Ko00624) 2) Ethylbenzene degradation – деструкция этилбензола (Ko00642). Следовательно, основываясь на функциональном анализе, можно сделать вывод, что изучаемые сообщества хорошо адаптированы к разложению полициклических ароматических соединений.

Таким образом, нами изучены таксономическое разнообразие и функциональный потенциал в сообществах хемоземов озера Атаманского Ростовской области. А полученные данные о таксономическом и генетическом разнообразии почвенных микробных сообществ позволяют оценить потенциал бактерий-деструкторов ПАУ в техногенно-преобразованных почвах. В дальнейшем накопленная информация позволит улучшить стратегии для мониторинга воздействия загрязняющих веществ на экосистему.

*Работа выполнена при поддержке РНФ № 19-74-10046.*

## Литература

1. *Bolger A.M., Lohse M., & Usadel B.* (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
2. *Meyer F., et al.* (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics 9:386, doi:10.1186/1471-2105-9-386
3. *Nurk S. et al.* (2013) Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: Deng M., Jiang R., Sun F., Zhang X. (eds) Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science, vol 7821. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0_13
4. *Rotmistrovsky K. and Agarwala, R.* (2011) BMTagger: Best Match Tagger for Removing Human Reads from Metagenomics Datasets. ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/bmtagger/

# Разнообразие микробиома толстой кишки при язвенном колите: молекулярно-генетический подход и прикладное значение

*Круглов Е.Е.*

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара
(Институт экспериментальной медицины и биотехнологии), krugegr@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37904

Методические подходы к изучению микробиома претерпевают существенные изменения на современном этапе развития науки. Использование передовых достижений фундаментальной науки в раскрытие причин и патогенеза заболеваний происходит и в отрасли воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК).

Применение секвенирования гена 16s-рРНК обеспечивает понимание о структуре популяции различных экологических ниш. С недавнего времени данный подход стал активно использоваться в расширении представлений о патогенезе и этиологии заболеваний человека [2, 3]. В литературе преимущественно рассматривается изучение метагеномного состава биологических жидкостей, например, кала, по которому производится оценка состояния кишечника [5, 6]. Язвенный колит поражает преимущественно дистальные отделы кишечника – сигмовидную и прямую кишку и «золотым» стандартом диагностики является колоноскопия с гистоморфологической оценкой биоптатов слизистой оболочки толстой кишки, однако сведения о структуре микробиома зон язвенных дефектов достаточно разрознены. Нами была предпринята попытка дополнить существующий пул данных данными о структуре микробиома слизистой оболочки толстой кишки пациентов с язвенным колитом, проживающих в Самарской области.

В рамках исследования была собрана группа пациентов, имеющих гистологически установленный диагноз язвенный колит. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Для участия было приглашено 25 человек (n = 25), обоих полов, средний возраст составил 35,6±3,5 года, методический подход к установлению диагноза, экстракции и сохранению биологического материала описан в исследованиях Суворовой Г.Н. с соавт. (2018) [2]. Порции биоматериала отбирались с визуальной

здоровых зон и пораженных поверхностей в стандартных точках, регламентированных протоколом эндоскопического исследования. Биопсийный материал сохранялся при температуре -70 °С. Для составления метагеномных библиотек производили секвенирование регионов V3-V4 гена 16 s-рРНК, программный анализ производили с использованием «Kraken 2», «Pavian», визуализация была осуществлена при помощи «Recentrifuge». Генетическое секвенирование осуществлялось на платформе HiSeq 2500 Illumina (США) в Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов в ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России.

По результатам статистической обработки данных с применением U-критерия Манна-Уитни было выделено несколько статистически достоверных паттернов по которым было выявлено достоверное различие в структуре популяции микробиома здоровой и пораженной зон. В биоптатах пораженного участка толстой кишки по сравнению со здоровыми участками отмечалось: уменьшение доли таксона *Firmicutes* на 2,43%, бактерий порядка *Proteobacteria* на 2,70%, увеличение группы *Bacteroidetes* на 5,62%, а также увеличение микроорганизмов из таксона *Actinobacteria* на 0,09% [1]. Диапазон изменений в микробиоте достаточной незначительный, что находит отражение в литературе и описывается как одна из проблем проведения сравнения метагеномных данных в группе с различными пациентами. Выявлены значительные изменения только между обследуемыми или среди образцов, взятых у одного и того же пациента, что связано с индивидуальными различиями микробиоты и дифференциацией в соотношении микробиоты в срезах толстой кишки. В рамках исследовательского поиска был проведен скрининг на изменения со стороны бактерий *Filobasidium uniguttulatum*, *Saccharomyces cerevisiae, Xylariales, которые ранее отмечались* исследовании G. Liguori с соавт. (2016) [3] как патогномоничные при воспалительных заболеваниях кишечника, однако в нашем исследования достоверных различий обнаружено не было.

При проведении метагеномного исследования выявляется проблема отсутствия единой «стандартной» платформы, позволяющей использовать сторонние базы данных здоровых людей, пациентов с язвенным колитом проживающих в различных регионах мира. На настоящий момент метагеномика является бурно развивающейся отраслью, в рамках одной исследовательской группы в течение 2–3 лет идет существенная корректировка в отношении проведения взятия биоматериала, подготовки библиотек, отбора групп пациентов, количества выборки, а также смены программных пакетов при обработке данных. Важными критериями при выборе метагеномной базы данных являются: особенности образцов, взятых для анализа (биоптат слизистой оболочки, кал); возраст исследуемых пациентов; продолжительность считывания; метод секвенирования; метагеномный конвейер; количество образцов, взятых из биопсии из определенных участков кишечника; метод сбора материала [4, 6].

Выводы. По итогам сравнительной оценки структурного состава микробиоты было отмечено, что на настоящем этапе развития науки диагностическая значимость применения 16s-рРНК секвенирования при диагностике ВЗК имеет низкую значимость. Однако проведенное исследование ставит вопрос о необходимости выработки единых методических критериев проведения подобных исследований, а также расширение покрытия метагеномными исследованиями групп пациентов в различных регионах и половозрастных категориях. Накопление генетических библиотек микробиоты, а также ее депонирование в открытом доступе в сети Интернет позволит исследователям использовать их в своих исследованиях в качестве группы сравнения.

## Литература


1. Метагеномный анализ биоптатов толстой кишки пациентов с язвенным колитом / Н.А. Буланцев, А.С. Комиссаров, Е.И. Кошель, Е.Е. Круглов, Ю.В. Мякишева, Л.А. Кафтырева // Гены & Клетки. –2020. – Т. XV, № 3, Приложение – С. 129.
2. Гистологическая картина и микробный пейзаж при язвенном колите / Г.Н. Суворова, Ю.В. Мякишева, С.Е. Каторкин, П.С. Андреев, О.Е. Давыдова, А.В. Лямин, Е.Е. Круглов, П.А. Сухачев // Вестник новых медицинских технологий – 2018. – Т. 25, № 4 – С. 170–175.
3. Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients / G. Liguori, B. Lamas, M. L. Richard [et al.] // J. Crohns Colitis. – 2016. – Vol. 10. – P. 296–305.
4. Microbiome Survey of the Inflamed and Noninflamed Gut at Different Compartments Within the Gastrointestinal Tract of Inflammatory Bowel Disease Patients / J. Forbes, G. Van Domselaar, C. Bernstein // Inflammatory Bowel Diseases. – 2016. – Vol. 22(4). – P. 817–825.

5. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease / A. Walker, J. Sanderson, C. Churcher [et al.]. – Text : electronic // BMC Microbiology. – 2011. – Vol. 11(1). – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219646/ (date of access: 09.03.2020).
6. Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease / F. J. Ryan, A. M. Ahern, R. S. Fitzgerald [et al.] // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11(1). – P. 1512.

# Метаболические пути и энергетический баланс окисления лактата различными микроорганизмами

*Минкевич И.Г., Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), minkevich@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37905

L-лактат (молочная кислота) представляет большой интерес с точки зрения биохимии и физиологии живых организмов, а также биотехнологии, медицины и экологии. В качестве конечного продукта гликолиза он играет большую роль в метаболизме. В пищевой промышленности L-лактат используется в качестве индикатора свежести и стабильности продуктов при хранении, подкислителя и ароматизатора (Е270), что чрезвычайно важно для контроля качества конечных продуктов. L-лактатный анализ незаменим в области клинической медицины, так как, являясь критическим метаболитом оксигенации тканей, L-лактат широко используется как биомаркер и индикатор различных патологий. Наконец, молочная кислота содержится в сточных водах молочных предприятий и должна быть удалена из сбросов.

В аспекте метаболизма лактата представляют интерес пути и энергобаланс его полного окисления. Важным показателем энергобаланса является количество макроэргических связей, образуемых в этом процессе в расчёте на одну молекулу потреблённого лактата.

Способность микроорганизмов использовать молочную кислоту в качестве субстрата роста достаточно широко распространена в природе среди микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей и водорослей. В утилизации L-лактата в разных организмах участвуют различные оксидоредуктазы. Стехиометрия каждой реакции, потенциально участвующей в этом процессе, известна, и её можно найти в различных источниках (статьи, книги и базы данных в Интернете). Задача заключается в составлении сбалансированных метаболических схем полного окисления лактата и, на их основе, подсчёте количества формируемых макроэргических соединений. Это позволяет сравнить энергетическую эффективность метаболизации лактата. Решению этой задачи и посвящена данная работа.

## Материалы и методы

Использован пакет компьютерных программ GenMetPath, разработанный в ИБФМ [1–3]. Локальная база данных, использованная этим пакетом, содержит намного большее количество реакций и веществ, чем те, что реально участвуют в окислении лактата. Программа выбирает из них те реакции, которые обеспечивают такой биохимический процесс, и подсчитывает скорости всех этих реакций при заданной скорости первичного окисления субстрата.

## Результаты и обсуждение

В таблице даны найденные нами значения потоков через реакции, составляющие пути полного окисления лактата в расчёте на единицу потреблённого субстрата (лактата) в молях. Потоки, равные нулю (выделено серой заливкой) означают, что данная реакция не участвует в соответствующем варианте метаболического пути. Варианты **I**–**IV** соответствуют различным ферментам, осуществляющим первичное окисление лактата. Последняя строка в таблице показывает количество сформированных мак-

роэргических связей. В вариантах **I–III** это исключительно ATP, в варианте **IV** – 6ATP и одна молекула пирофосфата.

NAD-зависимая лактатдегидрогеназа не входит в число реакций окисления лактата, так как она термодинамически необратима и всегда направлена в сторону синтеза, а не окисления лактата.

Из таблицы видно, что функционирование цикла трикарбоновых кислот от цитратсинтазы до малатдегидрогеназы не зависит от начальных этапов окисления лактата. Найденные метаболические пути отличаются друг от друга на начальных и конечных стадиях. В частности, лактатмонооксигеназа окисляет лактат по схеме лактат + $O_2$ = ацетат + $H_2O$ + $CO_2$, вследствие чего ацетил-КоА образуется ацетил-КоА синтетазой с затратой ATP. Это приводит к заметному снижению количества образованных макроэргических связей по сравнению с другими вариантами путей окисления лактата. В вариантах **I–III** ацетил-КоА образуется пируватдегидрогеназным комплексом.

Основываясь на энергетике окисления лактата, можно сделать вывод, что для очистки сточных вод от сбросов молочной кислоты более выгодны штаммы, содержащие лактатмонооксигеназу – окисление лактата сопровождается наименьшим образованием макроэргических связей и, следовательно, меньшим ростом биомассы в расчёте на одно и то же количество потреблённого субстрата. Штаммы, содержащие лактатоксидазы, потенциально способны расти более быстро, что может иметь как положительное, так и отрицательное влияние в зависимости от того, в каких процессах участвуют соответствующие микроорганизмы.

| | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| Лактатоксидаза растворимая | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Лактатоксидаза мембраносвязанная | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Лактатоксидаза (цитохром *b*) | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Лактатмонооксигеназа | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Пируватдегидрогеназный комплекс | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Ацетил-КоА синтетаза | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Цитратсинтаза | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Аконитаза | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Изоцитратдегидрогеназа | 1 | 1 | 1 | 1 |
| α-кетоглутаратдегидрогеназа | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Сукцинил-КоА синтетаза (GTP) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Сукцинатдегидрогеназа (комплекс II) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Фумараза | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Хинонзависимая малатдегидрогеназа | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Электронтранспортная цепь (комплекс I) | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Электронтранспортная цепь (комплекс III) | 5 | 6 | 5 | 4 |
| Электронтранспортная цепь (комплекс IV) | 2.5 | 3 | 3 | 2 |
| ATPсинтаза | 8 | 9 | 8.5 | 6 |
| Каталаза | 0.5 | 0 | 0 | 0 |
| ATP-GDP фосфотрансфераза (GDP→ATP) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Общее число сформированных макроэргических связей на 1 лактат | 9 | 10 | 9.5 | 7 |

## Литература


1. *Minkevich I.G.* Stoichiometric synthesis of metabolic pathways. // Computer Research and Modeling. – 2015. – V. 7. – No. 6. – P. 1241–1267.
2. *Минкевич И.Г.* Математические проблемы организации метаболических путей из биохимических реакций. // Математическая биология и биоинформатика. – 2016. – Т. 11. – No 2. – С. 406–425.
3. *Minkevich I.G.* Estimation of Maximal Values of Biomass Growth Yield Based on the Mass-Energy Balance of Cell Metabolism. Computer Research and Modeling. – 2019. – V. 11. – No. 4. – P. 723–750.

# Индикаторные микроорганизмы почв вблизи железнодорожных станций на территории г. Саратова

*Мурзина Ю.И.[1], Коробейникова А.С.[1], Глинская Е.В.[1], Нечаева О.В.[2]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
[2] Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина, Саратов,
yuliya.murzina.2000@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37906

Нефть является одним из тех техногенных загрязнителей, при разливах которой на длительное время нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное плодородие и резко меняется интенсивность процессов [1].

В связи с тем, что загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами носит глобальный характер, специалисты совершенствуют методы оценки состояния почв. Среди таких методов микробиологический метод является наиболее чувствительным. По реакции микроорганизмов-индикаторов можно отслеживать действие токсических веществ и даже прогнозировать с их помощью изменения качества окружающей среды [2, 3].

Целью исследования было выделение индикаторных микроорганизмов азотного цикла из почв вблизи железнодорожных станций на территории г. Саратова.

Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Отбор проб почв проводили в черте г. Саратова рядом с железнодорожными станциями: Саратов-1, Вагонное депо, Студгородок, Площадь Ленина, Трофимовский-1. Отбор проб осуществляли в стерильные контейнеры и доставляли в лабораторию в течение суток.

Для выделения индикаторных групп микроорганизмов, участвующих в круговороте азота, использовали метод последовательных разведений и поверхностного высева на плотные питательные среды. Для приготовления почвенной суспензии отбирали по 1 г почвы из каждой пробы, суспендировали в 99 мл стерильного физиологического раствора. В результате получали разведение $10^{-2}$ и из него последовательно готовили рабочие разведения до $10^{-7}$. По 0,1 мл почвенной суспензии высевали на питательные среды: Эшби – для азотфиксирующих бактерий, ГРМ + 0,1% $KNO_3$ – для денитрифицирующих бактерий, пептонный агар – для аммонифицирующих бактерий, среда Виноградского – для нитрифицирующих бактерий. Посевы инкубировали в термостате при температуре +28 °С в течение 1–3 суток.

Результаты показали, что в образцах почв вблизи железнодорожных станций присутствуют индикаторные бактерии азотного цикла, численность которых достигает 5 млн КОЕ/г почвы. Количественные показатели азотфиксаторов варьировали от 400 тысяч до 2 млн КОЕ в 1 г почвы, нитрификаторов – от 10 до 20 тысяч, денитрификаторов – от 1 до 3 млн, аммонификаторов – от 3 до 5 млн (таблица)

*Таблица*

**Количественные показатели индикаторных микроорганизмов (*M±m*, *p*≤0,05)**

| Места отбора проб | Численность Lg КоЕ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Азотфиксаторы | Нитрификаторы | Денитрификаторы | Аммонификаторы |
| Саратов-1 | 5,9±0,8 | 4,0±0,6 | 6,2±1,2 | 6,5±1,7 |
| Вагонное депо | 6,3±1,3 | 4,2±0,8 | 6,3±1,3 | 6,7±1,8 |
| Студгородок | 5,6±1,0 | 4,3±0,9 | 6,0±1,2 | 6,5±1,6 |
| Площадь Ленина | 6,0±1,3 | 4,3±1,1 | 6,5±1,4 | 6,5±1,7 |
| Трофимовский-1 | 6,2±1,2 | 4,3±1,0 | 6,0±1,1 | 6,6±1,3 |

Таким образом, из почв вблизи железнодорожных станций на территории г. Саратова выделены индикаторные микроорганизмы, участвующие в круговороте азота, численность бактерий свидетельствует о процессах самоочищения почв исследуемых территорий.

## Литература


1. *Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Логинов О.Н.* Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, № 4. С. 338–349.
2. *Александрова Е.Ю.* Биоиндикационная оценка качества городской среды // Проблемы развития территории. 2015. № 5. С. 170.
3. *Узких О.С., Хомяков Д.М., Донерьян Л.Г.* Чувствительность биологических показателей к уровням нефтяного загрязнения на различных типах почв // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2009. № 3. С. 16–20.


# Культивируемые бактерии из осадков техногенного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения солей


*Нечаева Ю.И.[1], Алеев В.С.[1], Белкин П.А.[1], Плотникова Е.Г.[1,2]*

[1] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, ulia-2012@mail.ru

[2] «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37907


Искусственный щелочной водоём, расположенный на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС), характеризуется высокой техногенной нагрузкой, которая обусловлена совместным воздействием промышленных предприятий, обеспечивающих комплексную разработку уникального месторождения (Белкин, 2008). Техногенный водоём представляет собой искусственный водный объект, ограниченный насыпными дамбами, площадь зеркала воды превышает 15 га. По химическому составу воды, присутствующие в водоёме, представлены щелочными рассолами (с общей минерализацией до 100 г/л) хлоридного натриево-кальциевого состава. За десятилетия существования этого водного объекта сформированы донные отложения мощностью до 5 м. С целью изучения особенностей осадконакопления произведен послойный отбор донных отложений на полную мощность техногенного осадка (до природных подстилающих отложений четвертичного возраста). Проходка колонок производилась специальным пробоотборником, с применением труб, изготовленных из химически инертного материала. В отобранных колонках ненарушенного строения выделены слои, характеризуемые различными морфологическими и органолептическими свойствами.

Цель работы – выделение и характеристика микроорганизмов из осадка техногенного водоема, расположенного на территории ВМКМС.

Для исследования выбрана колонка донных отложений (обозначенная № 2) с девятью характерными слоями, различающимися значениями pH (от 11 до 12), содержанием солей ($Na^+$ 5610 – 33632 мг/кг; $K^+$ 347 – 29447 мг/кг; $Mg^{2+}$ 1084 – <1 мг/кг), качественным и количественным составом органических соединений (содержание органического вещества от 5,33 до 1,72%). Для микробиологических исследований с соблюдением асептических условий взяты девять проб донных отложений из внутренней части колонки.

Накопительные культуры (НК) с исследуемыми образцами донных отложений (с обозначением 2.1 – 2.9) получены на минеральной среде Пфеннига (сПф) с содержанием 100 г/л NaCl, pH = 9,5. (Pfennig, 1965). При высеве НК на агаризованную минеральную среду Пфеннига (100 г/л NaCl; pH = 9,5) получены чистые культуры микроорганизмов, отличающиеся морфологией колоний, среди которых для дальней-

ших исследований отобрано 30 штаммов. Изучение морфологии клеток выделенных культур проведено с помощью метода иммерсионной микроскопии (Практикум по микробиологии, 2005). Грампринадлежность изолятов определяли на основе КОН-теста (Gregersen, 1978). Устойчивость выделенных штаммов бактерий к различным концентрациям хлорида натрия оценивали по появлению и размеру колоний на агаризованной сПф без NaCl и с его содержанием в пределах от 100 до 250 г/л.

По результатам проведенных исследований установлено, что в микробном сообществе донных отложений техногенного щелочного водоема присутствуют алкалофильные галотолерантные и галофильные бактерии. В 9 исследуемых образцах донных отложений обнаружено 14 различных морфотипов бактерий, среди которых 13 морфотипов представлены грамотрицательными бактериями с палочковидной формой клеток, а 1 морфотип – 8(2.8), относится к группе грамположительных бактерий и имеет клетки кокковидной формы. Стоит отметить, что наибольшее количество морфотипов (5) выявлено в одном из нижних слоев осадка, залегающем на глубине от 162 до 171 см (образец 2.3). Большинство изолятов способны к росту на сПф (pH = 9,5) как без NaCl, так и в его присутствии до 200 г/л NaCl. Грамотрицательные штаммы, выделенные из самого верхнего слоя осадка (образец 2.9), являются галофильными бактериями, растущими лишь в присутствии высоких концентраций соли (100–200 г/л NaCl).

Выделенные экстремофильные (алкалофильные галотолерантные и галофильные) бактерии представляют интерес для дальнейших исследований, в том числе, могут быть перспективны для использования в биотехнологических целях.

*Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.*

## Литература

1. *Gregersen T.* Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria // European journal of applied microbiology and biotechnology, 1978. Vol. 5. №. 2. P. 123–127.
2. *Pfennig N.* Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien // Anreicherungskultur und Mutantenauslese. Zentralbl. Bakteriol., I. Abt., Suppl., 1965. Vol. 1. P. 179–189.
3. *Белкин В.В.* Мониторинг геологической среды в процессе разработки калийных месторождений // Геоэкология. Инженерная геология, гидрогеология, геокриология, 2008. №. 1. С. 49–59.
4. Практикум по микробиологии: учебное пособие / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. С. 176.

# Особенности эволюции вирусов бактерий подсемейства *Tevenvirinae*

*Никулин Н.А.*[1], *Зимин А.А.*[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
n.nikulin@ibpm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37908

Вирусы бактерий или бактериофаги подсемейства *Tevenvirinae* представляют собой группу вирусов, типовым представителем которого является классический объект биологии – фаг Т4. Благодаря широкому изучению этого вируса и наличию в базах данных большого числа полных геномов родственных ему организмов (более 300), выделенных из различных экологических ниш, возможно рассмотрение экологических и молекулярных аспектов эволюции данных вирусов при помощи методов сравнительной геномики и филогенетики. Такое исследование важно как с точки фундаментального, так и прикладного значения. В случае фундаментального значения, оно позволяет выявить особенности эволюции достаточно изученных вирусов, которые могут быть свойственны вирусам других таксономических групп.

В случае прикладного – некоторые представители данного подсемейства значительное время являются одними из самых перспективных агентов фаговой терапии, что нами было продемонстрировано в одной из наших статей [1], понимание их эволюции позволит более детально подходить к отбору вирусов для целей терапии.

Цель работы – выявление одной из ключевых особенностей эволюции подсемейства *Tevenvirinae* – роли неканонических азотистых оснований ДНК в дивергенции родственных вирусов, а также ее соответствие современной таксономии этих вирусов.

В качестве объектов нами использовались 366 геномов *Tevenvirinae*, депонированных в GenBank. Нами использовались следующие методы сравнительной геномики: пан-геномный анализ при помощи средств GET_HOMOLOGUES, GET_PHYLOMARKERS, сравнительный анализ регионов геномов при помощи EasyFig, построение двудольной сети аминокислотная последовательность/геном, филогеномный анализ при помощи VICTOR. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей проводился при помощи BlastP и PSI-Blast.

Ранее нами было продемонстрировано, что близкородственные представители *Tevenvirinae* обладают схожим набором генов, чьи продукты связаны с синтезом неканонических оснований ДНК и их модификаций. Более того, большая часть генов, связанных с синтезом 5-гидроксиметилцитозина и его модификаций располагается в одном регионе геномов между генами шаперона сборки вершины капсида и ДНК полимеразой. Также у большинства вибриофагов данного подсемейства имеются геномные островки, связанные с синтезом 7-деазагуанина и его модификаций. На основании результатов, полученных ранее научной группой в состав которую входил один из соавторов [2] и на основании результатов других ученых, объединяя с нашими результатами, нами было сделано предположение, что изменение частоты обмена генетической информации и специфичности обмена находится в зависимости от наличия неканонических оснований и их модификаций, а также белков, связанных с ними (эндонуклеазы DenA и DenB, белки защиты от действия систем рестрикции-модификации IV типа и другие). Одним из основных факторов дивергенции вирусов является разделение экологических ниш, что соответствует механистической модели. Учитывая наши результаты, мы пришли к выводу, что вторым фактором являются неканонические основания. На основе этого нами была предложена следующая стратегия дивергенции предков *Tevenvirinae*. Во-первых, это занятие различных экологических ниш бактериями-хозяевами, в результате чего появился механический барьер. Это внесло наибольший вклад в дивергенцию предков этих вирусов. Затем происходила внутринишевая дивергенция путем накопления отдельными популяциями (клональными линиями популяции) предков *Tevenvirinae* генов, чьи белки связаны с неканоническими основаниями ДНК и изменением в результате возможностей к горизонтальному переносу генов (ГПГ) и к инфицированию различных популяций бактерий-хозяев, отличающихся по системам защиты от проникновения чужеродной ДНК. В результате изменения частоты и специфичности ГПГ позволили одним популяциям накапливать в большем количестве гены, необходимые для приспособления к определенной экологической ниши, другим же путем отбора сохранять наиболее значимые из этих генов. Таким образом, возможно существование популяций, способных к распространению по различным экологическим нишам (имеющих наибольшие возможности в ГПГ), а также популяций, наиболее приспособленных к определенной нише (сохраняющих гены, путем уменьшения ГПГ), что отражалось в результатах анализа, проведенного в работе [3].

Такая стратегия соответствует модели Постоянства-Разнообразия (Constant-Diversity), которая утверждает, что несколько клональных линий бактерий сосуществуют, обогащая генетическое богатство популяции, и они находятся под контролем благодаря стабилизирующему влиянию аналогичного разнообразия вирусов, которые охотятся на популяцию. Более того она предполагает, что молекулярные модули взаимодействия хозяин-фаг присутствуют одновременно в различных вариантах в любой момент времени в популяции (в отличие от модели Красной Королевы (Red Queen), предполагающей быструю смену таких модулей со временем эволюции). Это также может быть верно и для генов, связанных с неканоническими основаниями ДНК, предков *Tevenvirinae*, в связи с тем, что наличие или отсутствие таких генов позитивно или негативно влияет на возможности взаимодействия вирусов с популяциями (клональными линиями) бактерий.

Кроме аспекта выявления особенности эволюции *Tevenvirinae*, нами была рассмотрена корреляция между современной таксономией (ICTV) данного подсемейства и наличием генов, связанных с неканоническими азотистыми основаниями ДНК. На сегодняшний день данное подсемейство было преоб-

разовано и часть вирусов, чьи геномы мы использовали в работе были отнесены к новым подсемействам. Речь идет о большинстве вирусов Acinetobacter и Aeromonas. По полученным нами результатам филогеномнго, пан-геномного анализов, действительно, данные вирусы можно было отнести в другие рода или подсемейства, так как они образовывали достаточно удаленные ветви на деревьях. Кроме того, в подсемействе *Tevenvirinae* был выделен новый род *Pseudotevenvirus*, наиболее известный представитель которых фаг RB43. Также данный род по результатам нашего анализа образовывал отдельную кладу на деревьях, все его представители обладали гомологами белка, связанного с метилированием цитозина.

На сегодняшний день подсемейство *Tevenvirinae* содержит 12 родов. По результатам нашего анализа, каждый род обладал своим набором генов, связанных с неканоническими основаниями, свойственным всем представителям одного рода и имел определенный спектр хозяев, свойственным конкретным экологическим нишам. Такая классификация полностью соответствует предложенной нами стратегии эволюции подсемейства *Tevenvirinae* и результатам проведенного нами анализа. Кроме того, полученные нами результаты показали возможность использования генов, связанных с неканоническими основаниями, в качестве основных генетических маркеров для таксономии бактериофагов.

## Литература


1. *Никулин, Н.А., Кононенко, С.И., Кощаев, А.Г., Зимин, А.А.* (2017). Конструирование терапевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа: преимущества и недостатки. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, (133). doi:10.21515/1990-4665-133-063
2. *Taniashin, V.I., Zimin, A.A., Shliapnikov, M.G., and Boronin, A.M.* (2003). Transduction of plasmid antibiotic resistance determinants with pseudo-T-even bacteriophages. Russian J. Genet. 39, 761–772. doi:10.1023/A:1024748903232
3. *Nikulin, N.A., and Zimin, A.A.* (2021). Influence of Non-canonical DNA Bases on the Genomic Diversity of Tevenvirinae. Front. Microbiol. 12:632686. doi:10.3389/fmicb.2021.632686


# Бактерии микробных сообществ растений, пораженных фитопаразитическими членистоногими


*[1]Оспенников Ю.В., [1]Демидов А.В., [1]Присяжная Н.В., [1]Дорофеева Л.В., [2]Чижов В.Н., [2]Субботин С.А., [1]Евтушенко Л.И.*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов)
[2] Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 664nod@zoho.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37909


Микробные сообщества растений, пораженных фитопаразитическими членистоногими, изучены весьма слабо. В настоящей работе представлены результаты оценки численности культивируемых бактерий в микробных сообществах растений, инфицированных листовыми минерами (насекомыми-вредителями, жизнь которых проходит внутри растения) и галлообразующими клещами. Образцы для анализа были собраны на территории Москвы и Московской области в 2020–2021 гг.

Были исследованы листья черёмухи обыкновенной (*Prunuspadus*), осота розового (*Cirsiumarvense*), полыни (*Artemisia sp.*), конского каштана (*Aesculus sp.*), ивы (*Salix sp.*), и представителей семейства зонтичных (*Umbelliferae*) с признаками поражения минирующими насекомыми, а также галлов на липе (*Tilia sp.*), индуцированных галлообразующими клещами.

Участки листа (1 см$^2$), поражённые и без выраженных внешних признаков поражения (контроль), или отдельные галлы отмывали в дистиллированной воде в течение 30 минут с использованием шейкера. К исходному и обработанному раствором этилового спирта растительному материалу добавляли 1 мл физраствора и гомогенизировали в ступке. Суспензию, а также первичные смывы с листьев, переносили в чашки Петри с агаризованной питательной средой R2A (Fluka) и растирали при помощи шпателя. Посевы культивировали при температуре 24–26 °С до 20 дней. Клетки бактерий из всех выросших колоний переносили на пробирки с той же средой. После рассева и проверки на чистоту, культуры анализировали методом МАЛДИ масс-спектрометрии с использованием прибора Autoflex Speed (Bruker Daltonics) и пакетов программ flexAnalysis 3.3 и Biotyper 3.0 как описано ранее [1]. Для идентификации использовалась база данных производителя и локальная база данных «ВКМ-МАЛДИ», включающая масс-спектры типовых штаммов бактерий ряда семейств и практически-значимых групп (в т.ч. фитопатогены), слабо представленных в базе данных Bruker.

Было изолировано более 800 штаммов, из них более половины были успешно идентифицированы до рода. В значительном количестве выявлены актинобактерии семейства *Microbacteriaceae* – представители родов *Clavibacter*, *Curtobacterium* и *Rathayibacter* (включающих преимущественно фитопатогенные виды) на атипичных для этих микроорганизмов хозяйских растениях, и родов *Agreia*, *Frigoribacterium*, *Plantibacter*, виды которых часто ассоциированы с растениями [2]. Кроме того, обнаружены актинобактерии семейства *Micrococcaceae* (*Micrococcus*, *Kocuria*), эндоспоровые (*Bacillus*, *Brevibacillus*) и протеобактерии (*Methylobacterium*, *Pantoea*, *Sphingomonas*).

Среди идентифицированных методом МАЛДИ масс-спектрометрии штаммов актинобактерий обнаружены (от общего количества колоний из высевов разных образцов на чашках): представители *Rathayibacter* (липа, до 14,5%; осот, 3,8%; конский каштан, 17,4%; зонтичные, 20%), *Curtobacterium* (осот, 3,8%; конский каштан, 13,3%), *Clavibacter* (липа, 7,3%; конский каштан, 1,7%; ива, 14,3%; зонтичные, 4,0%), *Plantibacter* (липа, 1,8%; осот, 30,8%), *Frigoribacterium* (липа, 32,1%; конский каштан, 1,7%; зонтичные, 4,5%; ива, 7,7%), *Agreia* (3,6%, липа). В ряде случаев доля определенных до рода (вида) бактерий, выделенных из пораженных растений, была выше, чем изолятов из здоровых растений. Среди изученных штаммов выявлен ряд потенциально новых видов.

Выполненное исследование может представлять интерес для специалистов в области экологии, защиты растений и поиска штаммов, перспективных для биотехнологии.

### Литература


1. *Prisyazhnaya N.V., Plotnikova E.G., Bueva O.V., Korsakova E.S., Dorofeeva L.V., Il'ina E.N., & Evtushenko L.I.* (2012). Application of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of closely related species of the "*Arthrobacter crystallopoietes*" phylogenetic group. Microbiology, 81(6), 696–701.
2. *Evtushenko L.I. Microbacteriaceae*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2015. (Ed: W.B. Whitman) (http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00035)


## Особенности симбиоза зеленой микроводоросли *Trebouxia* sp. с микобионтом в лишайнике *Parmelia sulcata*


*Павлова Е.А., Маслов А.И.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН), Helenalekseevna@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37910


Лишайники представляют собой сложный организм, состоящий из особого гриба, (микобионт), обычно – актиномицета, живущего в ассоциации с одним (иногда двумя) видом водорослей или цианобактерий (фотобионт).

Основу симбиоза определяет интеграция метаболических систем бионтов, объединяющая обмен основными элементами питания, такими как углерод и азот, которая отражает взаимосвязь генетических систем бионтов. Считается, что основная часть фотосинтетических продуктов, созданных водорослями, утилизируется в клетках микобионта. Подавляющее большинство видов лишайников (около 90%) содержит зеленые водоросли. Тем не менее, большая часть работ, связанных с изучением азотного метаболизма, проведена именно с цианобактериальными лишайниками, что связано со способностью цианобионтов к фиксации атмосферного азота. Лишайники, содержащие зеленые водоросли, значительно менее изучены.

Оъектом нашего исследования является лишайник *Parmelia sulcata*, имеющий фотобионтом зеленую водоросль *Trebouxia sp.*

На изолированных микобионте и фотобионте из таллома лишайника *Parmelia sulcata* было показано существенное различие между ними в отношении ассимиляции нитрата. Препарат очищенного фотобионта, зеленая водоросль *Trebouxia sp.,* оказался неспособным к поглощению нитрата. Препараты микобионта и фрагментов таллома, содержащие оба бионта, поглощали нитрат т.е. ассимиляция нитрата осуществлялась в клетках микобионта. Форма, в которой азот транспортировался в клетки фотобионта была установлена с помощью хроматографического и изотопного масс-спектрометрического анализа аминокислот, экскретируемых микобионтом после инкубации с $Na^{15}NO_3$. Наиболее высокое обогащение меченым азотом наблюдалось в аланине и неидентифицированном веществе «Х». Это вещество имеет аминокислотную природу, однако установить его принадлежность к какой-либо из обычных аминокислот с помощью стандартного аминокислотного анализа не удалось. С использованием масс-спектрометрической техники, сопряженной с жидкостной хроматографией высокого давления было установлено, что вещество «Х» имеет сложную природу и содержит ряд дипептидов: глицин-серин, глицин-пролин, серин-пролин, фенилаланин-лейцин и триптофан-триптофан. Кроме того, присутствовали нестандартные аминокислоты: гидроксиаспартат и 2-аминобутират.

Таким образом установлено, что переносчиками азота от микобионта к фотобионту у лишайника *Parmelia sulcata* помимо аланина могут быть дипептиды. Возможно, что они кроме транспортной, выполняют и регуляторные функции, участвуя в контроле микобионта над жизнедеятельностью фотобионта.

## Новая термофильная метаноархея из подземной биосферы

*Петров П.Д.[1], Трубицын В.Э.[2], Ошуркова В.И.[2]*

[1] Факультет биотехнологии МГУ им. Ломоносова, г. Москва;
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), г. Пущино
paulik2012@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37911

Термофильные метаногены представляют собой уникальный объект для исследований, поскольку обладают высокими скоростями роста и способны осуществлять интенсивный процесс метаногенеза. В связи с этим термофильные метаноархеи рассматриваются в настоящий момент в качестве наиболее перспективных агентов для использования в биотехнологиях защиты окружающей среды. Как стало известно в последнее время подземная глубинная биосфера населена уникальными микроорганизмами и является источником выделения термофильных прокариот с уникальными свойствами.

Исследование микробного разнообразия методом shotgun-секвенирования по гену 16S рРНК образцов воды из буровой скважины 3Р (N58°50’, E81°30’), полученных сотрудниками растений ТГУ в ходе экспедиции на западный берег реки Обь в Томской области, Западная Сибирь, показало, что представители *Methanobacteriaceae* составляют 24% полученных последовательностей [1].

Посев образцов воды на минеральную среду с добавлением $H_2$ и $CO_2$ в качестве источников углерода и энергии позволил получить через 12 мес термофильную метаногенную накопительную культуру. Дальнейшие посевы в десятикратных разведениях с антибиотиками привели к получению чистой культуры штамма К4.

Цель работы состояла в изучении морфологических, физиологических и генетических особенностей нового исследуемого штамма термофильной метаногенной археи.

Полученные результаты показали, что новый штамм являлся термофильным метаногеном, использующим в качестве субстратов смесь H2/CO2 и формиат, оптимально растущим при pH 7,0–7,2. Клетки представляли собой длинные изогнутые неподвижные палочки. Штамм оптимально рос при температуре 60 °С. Рост в значительной степени стимулировался смесью витаминов.

Нами была получена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма К4 длиной 1220 н.п. Филогенетический анализ по трём методам (пакет программ MEGAX) показал, что штамм кластеризуется с представителями рода *Methanothermobacter*, ближайшим типовым штаммом является *Methanothermobacter marburgensis* DSM $2133^T$ со сходством 99,5%.

Для дальнейшего анализа был секвенирован геном штамма К4. Для сборки генома использовался пакет программ онлайн-сервиса KBase [2]. Секвенирование генома произведено компанией BioSpark (Троицк, Россия) на платформе Illumina NovaSeq 6000. Обработка ридов проводилась в программе Trimmomatic v0.36, качество библиотек определялось в программе FastQC v0.11.9. Для сборки генома использован ассемблер SPAdes v3.15.3 [3]. После сборки завершённость генома была оценена с помощью CheckM v1.0.18, она составила 98,4%, контаминация 0,25%. Для проверки исходные риды были выровнены в программе bowtie2 v2.3.2, общее количество выровненных ридов составило 24476640 (90,74%), среднее покрытие было 1282,8х.

Полученный геном состоял из 12 контигов, общая длина которых составила 1744648 н.п. (длина без пропусков – 1741570 н.п.), N50 был равен 572094 н.п., L50 – 2, GC состав 48,59%. Общее количество предсказанных генов – 1439 (QUAST).

Аннотирование генома в онлайн-сервисе RAST [4] позволило обнаружить 1894 гена, из них 1854 CDS и 40 РНК, в том числе 37 тРНК и по 1 копии 5S, 16S и 23S рРНК. Также с помощью онлайн-сервера DFAST были обнаружены 4 CRISPR повтора. Анализ метаболических путей был выполнен с помощью инструментов KEGG BlastKOALA [5], установлены метаболические функции 56,9% белковых последовательностей. Анализ метаболических путей организма позволил выяснить, что в геноме штамма К4 есть набор генов метаногенеза из $CO_2$ (M00567), а также из ацетата (M00357). Помимо этого, он способен к биосинтезу коферментов F420 (M00378) и CoM (M00358), ключевых ферментов автотрофного образования метана.

Таким образом, нами получена первичная фенотипическая характеристика нового термофильного метаногена. Филогенетический анализ показал, что исследуемая метаноархея штамм К4 относится к роду *Methanothermobacter* с ближайшим родственным видом *M. marburgensis*. Проведены секвенирование, сборка и аннотирование генома нового штамма, получены данные о его метаболических путях. Результаты исследования могут быть полезны для исследований в различных областях биотехнологии, в том числе связанных с получением термостабильных ферментов, очисткой промышленных стоков и производством биотоплива.

## Литература


1. *Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Banks D. et al.* Stable and Variable Parts of Microbial Community in Siberian Deep Subsurface Thermal Aquifer System Revealed in a Long-Term Monitoring Study. Front Microbiol. 2016 Dec 27; 7:2101. doi: 10.3389/fmicb.2016.02101. eCollection 2016.
2. *Arkin A., Cottingham R., Henry C., Harris N. et al.* (2018). KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. Nature Biotechnology. 36. 566-569
3. *Bankevich A., Nurk S., Antipov D. Gurevich A.A. et al.* J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021. Epub 2012 Apr 16.
4. *Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J. et al.* Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42 Nucleic Acids Res. 2014 Jan; 42:D206-14. doi: 10.1093/nar/gkt1226. Epub 2013 Nov 29.
5. *Kanehisa M., Sato Y., Morishima K.* (2015). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. Journal of Molecular Biology. 428. 10.1016/j.jmb.2015.11.006.

# Метагеномный анализ в изучении бактериальных сообществ прибрежных акваторий Японского моря

*Писарева Е.О.[1], Богатыренко Е.А.[1], Дункай Т.И.[1,2]*

[1] ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток
[2] ННЦМБ им. А.В. Жирмунского, г. Владивосток, pisareva.eo@students.dvfu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37912

Метагеномика – это раздел молекулярной генетики, изучающий совокупность генов всех микроорганизмов в изучаемом образце среды – метагеном. Метагеномный анализ позволяет выявить видовое разнообразие исследуемых образцов без необходимости культивирования, ведь более 99% микроорганизмов, наблюдаемых в природе, обычно не культивируются с использованием стандартных методов. Они редко численно доминируют в сообществах, из которых были получены: вместо этого они изолируются благодаря своей способности быстро расти в колонии на искусственных питательных средах [1, 2].

Японское море – окраинное море Тихого океана, омывающее берега России, Японии, Республики Корея и КНДР. Оно имеет значительный природно-ресурсный потенциал, способствующий развитию рекреационного, лечебно-оздоровительного и культурно-бытового морского водопользования населения. Японское море обладает своеобразными физико-географическими свойствами и подвержено сильной антропогенной нагрузке, связанной с увеличением численности населения, урбанизацией побережий, индустриализацией и развитием туризма в Дальневосточном регионе России [6].

В настоящее время в литературе имеются ограниченные сведения о видовом разнообразии микроорганизмов Японского моря, комплексных исследований проведено не было. В основном, работы посвящены изучению культивируемых форм, составляющих лишь малую долю всего огромного разнообразия микробных сообществ, но являющихся их неотъемлемой составляющей. Многие виды микроорганизмов, выявляемые из морской воды, являются аллохтонными, привнесенными с речным стоком или органическим веществом. Однако существуют и истинно морские виды, такие как *Alcaligenes*, *Marinomonas* и другие [10]. Культивируемые бактерии, являясь частью микробных сообществ, всегда будут присутствовать в выделяемых образцах. Значит, изучив такие работы, мы сможем оценить часть всего разнообразия микроорганизмов Японского моря.

Для российских вод Японского моря достоверно описаны или указаны следующие группы бактерий: Proteobacteria (самые часто встречаемые классы – γ-, α-, β-Proteobacteria), Bacteroidetes (Flavobacteria, Bacterodia), Firmicutes (Bacilli, Clostridia), Cyanobacteria (Oxyphotobacteria) и Actinobacteria (Acidimicrobia, Actinomycetia) [3, 10]. Общие тенденции и закономерности таксономического распределения бактерий не отличаются от общих закономерностей Мирового океана, так как Японское море не имеет сильно специфических особенностей. Однако у региона сильно выражена антропогенная нагрузка. Это значит, что будут преобладать бактерии, способные к деградации поллютантов, сложных органических соединений.

В основном, работы посвящены изучению отдельных свойств культивируемых форм микроорганизмов, например, устойчивость к поллютантам (нефти, тяжелым металлам), способность к деструкции нефтяных углеводородов, антимикробные свойства, ферментативная активность, биологические свойства, в том числе факторы патогенности [5, 8, 9]; исследуется состояние вод и степень загрязненности акваторий, распределение и динамика численности микроорганизмов [4, 11]. Однако данные работы не дают полного представления о составе микробных сообществ Японского моря, а показывают лишь малую часть всего разнообразия микроорганизмов.

Однако проводился метагеномный анализ поверхностных вод бухты Находка [7]. Анализ данных показал, что основу прокариотного сообщества бухты составляли бактерии филогруппы Proteobacteria (59%) и Bacteroidetes (31%), Actinobacteria (2%) и Verrumicrobia (1%). Представители филумов Firmicutes, Chloroflexi, Tenericutes, Fusobacteria, Cyanobacteria, Parcubacteria, Fibrobacteres, Planctomycetes встречались в морской среде в очень низкой концентрации (менее 1% от всех бактерий). Неклассифицированные бактерии составляли 7% от общего количества последовательностей.

Метагеномный анализ позволит установить филогенетическое разнообразие микроорганизмов Японского моря, ранее не изученное, выявить уникальные и возможно, новые таксоны, характерные для данного региона, оценить вклад микробного разнообразия Японского моря в общее разнообразие микроорганизмов Мирового океана. *Данные о разнообразии микробных сообществ могут быть использованы для оценки влияния абиотических и антропогенных факторов на структуру сообществ микроорганизмов.*

## Литература


1. *Amann R.I.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer. // Microbiol Rev. – 1995. – Vol. 59, № 1. – P. 143–169.
2. *Hugenholtz P.* Exploring prokaryotic diversity in the genomic era / P. Hugenholtz // Genome biology. – 2002. – V. 3, № 2.
3. The NCBI taxonomy database [Электронный ресурс] // The NCBI taxonomy database. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi
4. *Богатыренко Е.А.* Исследование влияния антропогенного загрязнения Японского моря на основе изучения биологических свойств бактериальных сообществ / Е.А. Богатыренко, А.В. Ким, Т.И. Дункай, А.И. Еськова // Понт Эвксинский: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных по проблемам водных экосистем, посвященной памяти д.б.н., проф. С.Б. Гулина. – Севастополь: Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН. – 2019. – С. 113–114.
5. *Бойченко Т.В.* Металл-резистентные микроорганизмы в поверхностных водах залива Владимира (Японское море) / Т.В. Бойченко // INTERNATIONAL INNOVATION RESEARCH: сборник статей победителей VII Международной научно-практической конференции. – Пенза: Наука и Просвещение. – 2017. – С. 15–20.
6. *Ващенко М.А.* Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия / М.А. Ващенко // Биол. моря. – 2000. – Т. 26, № 3. – С. 149–159.
7. *Голозубова Ю.С.* Микробиологическое разнообразие поверхностных вод бухты Находка Японского мор под действием антропогенного пресса / Ю.С. Голозубова, Л.С. Бузолева, Е.А. Богатыренко, А.В. Ким, А.В. Нерадько // Международная конференция и школа молодых ученых по измерениям, моделированию и информационным системам для изучения окружающей среды: ENVIROMIS-2018. – Томск: Томский центр научно-технической информации. – 2018. – С. 275–278.
8. *Дункай Т.И.* Нефтеокисляющий потенциал бактерий поверхностных вод Японского моря / Т.И. Дункай, Е.А. Богатыренко, А.В. Ким, Д.В. Дашков // Технические и естественные науки: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции. – С.-Пб.: ГНИИ «НАЦРАЗВИТИЕ». – 2020. – С. 11–12.
9. *Михайлов В.В.* Поиск и отбор проб бактериоцин-продуцирующих штаммов морских бактерий из экосистем акваторий Японского моря / В.В. Михайлов, Б.Г. Фндрюков, И.Н. Ляпун // Молекулярная генетика, микробиологи и вирусология. – 2019. – Т. 37, № 4. – С. 173–177.
10. *Михайлов В.В.* Прокариоты = Prokaryota: [определитель] / В.В. Михайлов // Владивосток: Дальнаука, Биота российских вод Японского моря. – 2004. – Т. 2. – 168 с.
11. *Христофорова Н.К.* Микробиологический контроль состояния вод бухты Новик (залив Петра Великого, Японское море) / Н.К. Христофорова, Т.В. Бойченко, А.А. Емельянов, А.В. Попова // Изв. ТИНРО. – 2017. – Т. 189. – С. 121–130.


# Устойчивость цианобактерий к загрязнителям как характеристика условий обитания на примере *Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek


*Пичугина Е.К.[1], Беандруна Суандзара Родлиш[1], Бенитсиафантука Элид Ульрих[1], Федоров А.С.[1], Годой Гуадамус Пабло[1], Мазина С.Е.[1,2]*

[1] Российский университет дружбы народов (РУДН), Институт экологии, pichugina94@inbox.ru
[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37913


Изменение условий обитания организмов определяют направление их эволюции. Одним из факторов, к которым вынуждены приспосабливаться виды, в условиях возрастающей антропогенной нагруз-

ки, являются различные загрязняющие вещества. Такие вещества могут быть результатом глобального загрязнения биосферы или попадать в местообитания за счет из близости к источникам загрязнений. Устойчивость организмов к росту в присутствии загрязнителей может характеризовать местообитание популяции и быть индикатором загрязнения местообитания. Периодические повторяющиеся воздействия также должны отражаться в адаптивных возможностях популяций, если воздействия имеют длительный характер. Таким образом можно ожидать, что снижение чувствительности к загрязняющему веществу у микробиоты может быть признаком, свидетельствующем о воздействии данного загрязнения и наличия соответствующих адаптаций. С целью проверки данной гипотезы было проведено исследование цианобактерий *Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek из сходных местообитаний различных регионов.

Вид *L. tenuis* выбран в связи с его широким распространением в различных регионах в составе литофильных сообществ фотических зон карстовых полостей. Входные зоны карстовых полостей рассматриваются как рефугиумы и экотоны, а сообщества, развивающиеся в них, чаще всего находятся в стадии климакса. Такие сообщества существуют в более стабильной обстановке, по сравнению с поверхностью, а негативные воздействия на них минимизированы. Предполагается, что время существования сообществ обрастаний фототрофов в фотических зонах полостей имеет большую продолжительность. Таким образом популяции и сообщества данных местообитаний могут иметь потенциал для использования в целях биоиндикации и биотестирования.

В качестве объектов исследования использовали альгологически чистые культуры *L. tenuis*, выделенные из входных зон пещер различных регионов: Новоафонской пещеры имени Гиви Смыр (Республика Абхазия, г. Новый Афон), Виашерской или Кизеловской (Пермский край, г. Кизел), пещер Воронцовская и Белоскальская (Краснодарский край, Хостинский район), Эмине-Баир-Хосар (Республика Крым, Симферопольский район), Женевская (Красноярский край), Ящик Пандоры (Республика Хакасия), Киндерлинская (Башкортостан).

Культивирование цианобактерий проводили в среде Бристоль (в модификации Голлербаха) при постоянном перемешивании, в эксперименте добавляли загрязняющие вещества в концентрациях 0,5; 1; 1,5; 2 ПДК. Проводили анализ изменения оптической плотности культуры относительно чистой среды при длине волны $\lambda = 540$ нм каждые 1–3 дня в течение 30 дней, определяли скорость роста культуры без загрязнителей и в их присутствии в среде. В качестве тестовых веществ были использованы: бенз[а]пирен, сульфат меди, нитрат свинца, формальдегид, керосиновая нефтяная фракция, фенол, бензол.

В результате проведенного исследования выявлена высокая устойчивость (скорость роста при 2 ПДК не ниже, чем в контроле) *L. tenuis* из пещеры Виашерская к фенолу; высокая устойчивость к керосиновой фракции у *L. tenuis* из пещер Новоафонская и Белоскальская: высокая устойчивость к формальдегиду у *L. tenuis* из пещеры Эмине-Баир-Хосар. Культуры *L. tenuis* росли при 1–1,5 ПДК, но со скоростью меньшей, чем в контрольных образцах, в присутствии: керосиновой фракции – культуры из пещер Воронцовская, Виашерская, Женевская, Ящик Пандоры, Киндерлинская; сульфата меди – культуры из пещеры Новоафонская; бенз[а]пирена – культуры из пещер Женевская и Ящик Пандоры; нитрат свинца – культуры из пещеры Белоскальская и Виашерская. Эксперименты с 0,5 ПДК тестируемых загрязняющих веществ позволили выявить чувствительные к некоторым загрязнителям культуры *L. tenuis*. Большинство культур были чувствительны к фенолу, бензолу и бенз[а]пирену. Наличие загрязняющих веществ в культуральной среде в концентрации выше ПДК приводило к замедлению скорости роста культуры или к гибели цианобактерий.

В результате эксперимента удалось выявить ряд культур, устойчивых к росту в присутствии ряда загрязняющих веществ. Такие культуры планируется использовать для выделения устойчивых штаммов и выявления механизмов их устойчивости.

Обнаружено, что наибольшей устойчивостью обладали культуры *L. tenuis*, выделенные из пещер, расположенных в черте города вблизи от автомобильных дорог, это пещеры Виашерская и Белоскальская.

# *Corynebacterium sanguinis* – новый представитель сапрофитной микрофлоры кожи лица

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

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь,
poludova76@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37914

Несмотря на высокие достижения в области антибактериальной терапии акне вульгарис и огромного количества новых знаний о природе данного заболевания, оно остаётся самым распространенным среди инфекций кожи во всём мире. Ключевую роль в возникновении акне отводят бактериям *Cutibacterium acnes*. Бактерии этого вида на ряду со стафилококками, являются одними из основных резидентов нормальной микробиоты кожи человека, доминируя в порах и волосяных фолликулах, играя важную роль в поддержании здоровья кожи (McLaughlin J. *et al.*, 2019). Однако, с развитием и широким применением генетических методов исследования в очагах воспаления выявляются представители новых видов сапрофитных бактерий.

Целью настоящей работы явилось идентификация бактерий, выделенных при процедуре «чистки лица» из зрелого воспаленного фолликула и изучение их биологических свойств.

Бактерии были выделены из очага воспаления при стандартной косметической процедуре чистки лица, как это было показано в работе Abdel Fattah и Darwish (2013). Колонии бактерий были получены при 37 °С на TYEG-агаре, обогащенном бычьим гемоглобином (0,1%) и фуразолидоном (2 мкг/мл) для подавления роста стафилококков (Ross *et al.* 2003). Для выявления нитратредуктазной активности выделенных бактерий использовали тест-диски (Nitrate reagent discs, «Himedia», Индия), а выращивание бактерий проводили на указанной питательной среде с добавлением 0,1% $KNO_3$ в анаэробных условиях. Способность к образованию индола определяли с помощью дисков (DMACA Indole Discs «Himedia», Индия) при росте бактерий на TYEG-агаре с добавлением 0,01% триптофана. Выделение ДНК из бактерий проводили набором реактивов «diaGene» (США). Идентификацию осуществляли на основе анализа гена 16S рРНК. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с универсальными бактериальными праймерами 27F (5`-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3`) и 1492R (5`-ACGG(C/T) TACCTTGTTACGACTT-3`) на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США).

Колонии выявленных бактерий обладали бежевой окраской, гладкой глянцевой поверхностью и через 4–5 суток инкубации достигали размера не более 2 мм. Бактерии, формирующие эти колонии оказались грамположительными палочками с характерным V и Y-образным расположением клеток друг относительно друга. Учитывая источник получения бактерий, их морфологические признаки и способность к росту в анаэробных условиях, изолят мог быть отнесён к представителям *C. acnes.* Однако, согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and laboratory standards institute (CLSI, США) к *C. acnes* следует относить палочковидных бактерий, с грамположительной окраской, растущих в анаэробных условиях, образующих индол и обладающих нитратредуктазной активностью (M-56A). Однако выделенные нами бактерии не обладали нитратредуктазной и индолобразующей активностями. Кроме того, более интенсивный рост бактерий наблюдался при их аэробном культивировании.

В результате секвенирования и сравнения последовательности гена 16S рРНК с типовыми штаммами из базы данных EzBioCloud [http://www.ezbiocloud.net] было установлено, что бактерии, выделенные из очага воспаления на коже лица являются близкородственными штамму *Corynebacterium sanguinis* CCUG 58655$^T$ (табл. 1). Уровень сходства по гену 16S рРНК с типовым штаммом составлял 100%. Штамм *C. sanguinis* CCUG 58655$^T$ был изолирован в 2009 г. из посевов крови пациента (Jaén-Luchoro *et al.*, 2020).

*Таблица 1*

**Анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК**

| Идентификация по гену 16S рРНК | | | |
|---|---|---|---|
| Близкородственный типовой штамм | Номер в GenBank | Сходство, % | Количество нуклеотидов |
| *Corynebacterium sanguinis* CCUG 58655$^T$ | FJ269041 | 100 | 1372 |

В настоящее время известно 120 видов рода *Corynebacterium*. Эти бактерии имеют широкий диапазон экологических ниш, включая почву, воду, продукты питания, и синтетические материалы. Некоторые виды являются возбудителями болезней человека или животных, другие представляют собой часть нормальной микрофлоры, хотя иногда могут вызывать инфекции (Bernard, 2012). Известные на сегодняшний день бактерии, идентифицированные как *C. sanguinis* были выделены из культур крови и образцов окружающей среды (Jaén-Luchoro *et al.*, 2020).

Таким образом, настоящее исследование впервые демонстрирует, что бактерии *C. sanguinis* могут быть представителями микрофлоры *acne vulgaris*, что особенно важно учитывать при выборе стратегии антибиотического воздействия, которое, как правило, нацелено на *C. acnes.*

## Литература


1. *Abdel Fattah N.S.A., Darwish Y.W. In vitro* antibiotic susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study // JEADV. 2013. V. 27, Is. 12. P. 1546–1551
2. *Bernard K.* The genus corynebacterium and other medically relevant coryneform-like bacteria // J. Clin. Microbiol. 2012. V. 50(10). P. 3152–3158.
3. *Jaen-Luchoro D., Gonzales-Siles L., Karlsson R., et al*. Corynebacterium sanguinis sp. nov., a clinical and environmental associated corynebacterium // Systematic and Applied Microbiology. 2020. V. 43, Is.1
4. *McLaughlin J., Watterson S., Layton A.M., Bjourson A.J., Barnard E., McDowell A. Propionibacterium acnes* and Acne Vulgaris: New Insights from the Integration of Population Genetic, Multi-Omic, Biochemical and Host-Microbe Studies // Microorganisms. 2019. V. 7(5)
5. M56 Principles and Procedures for Detection of Anaerobes in Clinical Specimens, 1st Edition. 2014. 152 p.
6. *Ross J.I., Snelling A.M, Carnegie E., Coates P., Cunliffe W.J., Bettoli V., Tosti G., Katsambas A., Galvan Peréz Del Pulgar J.I., Rollman O., Torok L, Eady E.A., Cove J.H.* Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe // BJD. 2003. V. 148, Is. 3. P. 467–478.


# Распространение и разнообразие микробного сообщества термального источника Еро, Монголия


*Раднагуруева А.А.[1], Цыренова Д.Д.[1], Ткачев П.А.[2], Лаврентьева Е.В.[1, 2], Бархутова Д.Д.[1]*

[1] Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, aryuna_rg@mail.ru

[2] Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37915


Байкальская рифтовая зона – самая крупная и активная тектоническая структура Евразийского континента. Рифтовая зона характерна огромным количеством термальных источников, каждый из которых уникален по своему гидрохимическому составу и генезису, что в свою очередь, влияет на разнообразие микробных сообществ.

Целью нашей работы являлись оценка состава и структуры микробного сообщества воды, микробных матов и донных осадков термального источника Ero, а также выделение и характеристика термофильных бактерий.

Объектами нашего исследования являлся термальный источник Ero с диапазоном температур воды гидротермы Ero составляла 41–43 °C, значения pH колебались от 9,27 до 9,34, минерализация была равна 232 мг/л.

Из источников Ero были выделены 4 культуры органотрофных бактерий. Клетки всех штаммов представляли собой палочки, у некоторых штаммов собранные в цепочки. Все культуры умеренные термофилы с оптимумом температуры роста при 40–50 °C, оптимум pH – 8,5–9,5.

Из микробных матов гидротермы Ero были выделены две культуры цианобактерий – Ero-1 и Ero-2. Трихомы у поперечных перегородок перешнурованные, к концам не суженные, до 2,5 мкм шириной, длина клеток до 3 мкм. Конечные клетки закругленные. На основе морфологических признаков обе культуры, лишь с некоторыми вариациями в размерах, являлись идентичными *Phormidium foveolarum* (Еленкин, 1949) или *Leptolyngbya foveolarum* (Komarek, Anagnostidis, 2007). Оптимальной температурой для роста культур являлась температура 40 °C. При снижении температуры культивирования до 30 °C и увеличении до 50 °C рост культур прекращался. Культуры Ero-1 и Ero-2 имели способность к росту при минерализации от 0 до 5 г/л с оптимумом при 5 г/л; при увеличении минерализации (100, 150 г/л) рост угнетался.

В источнике Ero цианобактерии были изучены впервые. Изученные организмы являлись термофилами с оптимумом роста при 40 °C, за исключение M122 – оптимум роста 45–55 °C. Культуры были идентифицированы до вида на основе морфологических признаков. С помощью анализа последовательности гена 16S рРНК идентифицированы штаммы M122 и S135 (Цыренова Д.Д., Алтанцэцэг Г., 2019 г.).

Для изучения состава микробного сообщества источника Ero было проведено высокопроизводительное секвенирование. По результатам секвенирования микробное сообщество донных осадков источника Ero характеризовались значительным видовым разнообразием бактерий, в составе которых выявлено до 349 филотипов (OTU), принадлежащих 32 филумам. Определено от 37132 до 55196 последовательностей, бактерии составляют до 98,45% микроорганизмов в донных осадках станции Ero-19-3 и 98,73% микроорганизмов в осадках станции Ero-19-2. В источнике Ero микробные сообщества донных осадков четырех станций сходны по наличию представителей основных фил бактерий, но таксономический состав этих двух сообществ различен. От 50,5% до 93,68% всех последовательностей микробного сообщества донных осадков четырех станций составляют 5 филумов *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*/*Chloroplast*, *Chloroflexi*, *Nitrospitae* и *Unclassified_Bacteria* доля последних составляет от 8,45 до 28,9% от всех последовательностей. В донных осадках обнаружены последовательности до 1,44%, относящиеся к *Archae.*

Наибольшее количество нуклеотидных последовательностей в сообществе микробных матов принадлежало представителям следующих таксонов: *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*/*Chloroplast*, *Chloroflexi*, и *Unclassified_Bacteria*. Чуть менее половины последовательностей (47,98%) в станции Ero-19-2 относится к *Unclassified_Bacteria.*

Микробное сообщество воды источника Ero отличалось небогатым разнообразием. Более 92% микроорганизмов воды станций Ero-19-1, Ero-19-2 и Ero-19-4 состоят из двух филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria.* Станция Ero-19-3 отличается большим разнообразие. Доминируют *Proteobacteria* (61,72%) остальные последовательности составляют филумы *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*/*Chloroplast*, *Firmicutes*, *Ignavibacteriae*, *Unclassified_Bacteria*, *Verrucomicrobia* и *Nitrospirae.*

*Работа выполнена в рамках темы госзадания № госрегистрации 121030100229-1.*

# Сульфатредуцирующие бактерии донных осадков северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря

*Рыжманова Я.В.[1], Пономарева А.Л.[2], Щербакова В.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
[2] Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева, ДВО РАН, г. Владивосток
ryzhmanova@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37916

Микробное диссимиляционное восстановление сульфатов до сульфида является преобладающим путем конечной деструкции органических веществ в морских донных осадках и вносит значительный вклад в биогеохимический цикл серы. Для изучения сульфатредуцирующего сообщества были использованы 54 образца морских донных осадков северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря, отобранные в рейсе LV92 НИС «Академик А.М. Лаврентьев» с 24.04.21 по 19.05.21. Донные осадки в сочетании с различными донорами электронов были использованы для получения 106 накопительных культур сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ).

В результате исследования активный процесс сульфидогенеза наблюдали в 16 мезофильных (20 °С) и 29 термофильных (60 °С) накопительных культурах. Преобладающая часть накопительных культур СВБ в качестве доноров электронов использовала лактат и $H_2$ в присутствии ацетата. Реже встречался сульфидогенез на смеси жирных кислот (бутират, пропионат, капроат) и метаноле. Рост на бензоате не был обнаружен. Данные координат отбора проб, горизонты и результаты культивирования морских донных осадков с различными донорами электронов, представлены в таблице 1.

Накопительные культуры СВБ, растущие при 6 °С, получить не удалось. Вероятно, выбранные нами условия культивирования не подходили для имеющегося психрофильного сульфатредуцирующего сообщества изучаемых объектов.

Обнаружение в 58% исследованных образцах донных осадков, имеющих среднегодовую температуру 1.7 °С, термофильных СВБ, по всей видимости, является результатом их заноса с подводных вулканов Курильской островной дуги (КОД), которых в настоящее время насчитывается около 104 (Рашидов и др., 2006), либо с близлежащих наземных вулканов Курильских островов и п-ва Камчатка.

Неожиданно низкий процент полученных мезофильных накопительных культур СВБ из места обитания с высоким содержанием сульфата, где СВБ как правило имеют высокую численность и преимущество перед другими терминальными деструкторами органического вещества, а также тот факт, что исследуемая зона отбора проб включает точки выхода абиогенного метана, привели к гипотезе стимуляции процесса сульфатредукции метаном в исследуемых образцах. Были выбраны 27 накопительных культур СВБ, в которых не был зафиксирован сульфидогезез в течение 3 недель культивирования при 20 °С. В итоге, в 59.3% накопительных культур СВБ через 2 недели после добавления метана наблюдалась активация сульфидогенеза, сопровождаемая процессом анаэробного окисления метана. Связь процесса сульфатредукции и анаэробной метанотрофии в морских осадках отмечена ранее (Jørgensen et al., 2019), однако этот процесс на чистых культурах СВБ до сих пор не подтвержден.

Продолжение данного исследования позволит выделить чистые культуры мезофильных и термофильных СВБ из полученных в ходе работы накопительных культур, а дальнейшее изучение метагенома ряда образцов, расширит наши знания о микроорганизмах, участвующих в биогеохимическом цикле серы в морских экосистемах и, в частности, в донных осадках северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря.

## Литература

1. *Рашидов В.А., Бондаренко В.И., Романова И.М., Палуева А.А.* (2006) Геофизические исследования подводных вулканов Курильской островной дуги в электронных информационных ресурсах Интернет // Геофизический

*Таблица 1*

**Микробиологический анализ донных осадков северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря с целью обнаружения СВБ**

| Станция | Координаты | | Глубина, м | Горизонт отбора пробы, см | Утилизируемые доноры электронов | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | E | | | 20 °C | 60 °C |
| LV92–1GC | 51.43718 | 156.2294 | 329 | 5, 25, 50, 100, 195 | $H_2$+ацетат (5**); лактат (25, 195); смесь ЖК (50) | $H_2$+ацетат (50); лактат (5, 50, 100, 195); смесь ЖК (50, 195); метанол (195) |
| LV92–4BC | 51.97342 | 155.1276 | 254 | 5–10 | лактат | –*** |
| LV92–6BC | 51.43127 | 156.049 | 572 | 10–15 | лактат | – |
| LV92–7BC | 51.56057 | 155.1975 | 414 | 0–5 | – | – |
| LV92–8BC | 51.3865 | 155.5677 | 703 | 10 | – | – |
| LV92–9BC | 51.20998 | 155.9326 | 687 | 10 | лактат | – |
| LV92–10BC | 50.97533 | 155.6522 | 625 | 5–7 | – | $H_2$+ацетат; лактат |
| LV92–11BC | 51.04105 | 155.5246 | 803 | 5–10 | – | лактат |
| LV92–12BC | 51.15162 | 155.2815 | 832 | 15 | – | – |
| LV92–13BC | 51.33112 | 154.9152 | 548 | 5–10 | – | – |
| LV92–15BC | 50.69568 | 155.4929 | 871 | 20 | – | лактат; смесь ЖК |
| LV92–16BC | 50.74057 | 155.3709 | 913 | 23–25 | – | – |
| LV92–17BC | 50.92975 | 154.9947 | 892 | 15–17 | – | – |
| LV92–18BC | 51.11078 | 154.6237 | 670 | 10–15 | – | – |
| LV92–19GC | 51.28493 | 154.2574 | 550 | 5, 50, 100, 250 | лактат (250) | $H_2$+ацетат (250); лактат (250) |
| LV92–20GC | 51.05187 | 153.9735 | 649 | 5, 50, 300 | лактат (5) | – |
| LV92–21GC | 50.86943 | 154.3523 | 766 | 5 | – | – |
| LV92–22GC | 50.63943 | 154.0569 | 789 | 5, 50, 100, 300 | лактат (5) | – |
| LV92–23GC | 50.51343 | 155.3105 | 809 | 5, 50, 200 | лактат (200) | лактат (50) |
| LV92–24GC | 50.51105 | 155.305 | 805 | 5 | – | лактат |
| LV92–26GC | 50.69263 | 154.7201 | 1040 | 50 | лактат | – |
| LV92–27GC | 50.50873 | 155.0838 | 1020 | 50, 300 | лактат (50, 300) | $H_2$+ацетат (50, 300); лактат (50, 300) |
| LV92–29GC | 51.78885 | 155.4886 | 294 | 50 | – | – |
| LV92–30GC | 51.58737 | 155.4867 | 458 | 50 | – | – |
| LV92–32GC | 51.17882 | 155.5163 | 828 | 50 | лактат | – |
| LV92–33GC | 51.04392 | 155.5205 | 789 | 10–15 | лактат | – |
| LV92–38GC | 50.52955 | 155.297 | 824 | 5 | – | – |
| LV92–41GC | 50.36087 | 154.6208 | 1433 | 5, 50, 200 | – | лактат (50, 200) |
| LV92–43GC | 50.57993 | 153.4098 | 881 | 160 | – | – |
| LV92–45GC | 50.22132 | 154.1416 | 1225 | 300 | – | лактат |
| LV92–46GC | 50.0337 | 154.5204 | 1660 | 100 | – | $H_2$+ацетат; лактат |
| LV92–47GC | 50.51545 | 155.3066 | 786 | 90 | – | $H_2$+ацетат; метанол |
| LV92–49GC | 50.54543 | 155.143 | 996 | 50 | – | лактат |

*Примечание*. Смесь ЖК* (г/л): бутират (0.7), пропионат (2.2), капроат (0.3); ** – в скобках указан горизонт отбора пробы (см), в котором обнаружен сульфидогенез; *** – сульфидогенез отсутствовал.

мониторинг Камчатки. Материалы научно-технической конференции, Петропавловск-Камчатский, 17–18 января 2006 г. Петропавловск-Камчатский: ГС РАН. С. 75–82.
2. *Jørgensen, B.B., Findlay, A.J., & Pellerin, A.* (2019). The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments // Frontiers in microbiology, 10, 849.

## Культивируемые микроскопические грибы в фитоочистных сооружениях разных географических регионов на примере Франции и Тайланда

*Сайнчук А.Д.[1,2], Александрова А.В.[1], Харитонов С.Л.[1], Щеголькова Н.М.[1]*

[1] Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов»,
alexandra49@inbox.lv

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37917

Тема загрязнения окружающей среды, в частности вод, становится всё более актуальной [1]. Рост населения стимулирует развитие производственных технологий и сельского хозяйства, соответственно увеличивается антропогенная нагрузка: количество и спектр загрязнителей расширяется [2]. В связи с этим актуальна разработка эффективных методов очистки вод [3].

Новым и относительно неизученным является метод фито-очистки, который позволяет экологично утилизировать поллютанты, параллельно решая проблему озеленения [4]. В сравнении с обычными водоочистными системами, фито-очистные сооружения (ФОС) довольно эффективны в утилизации загрязнителей антропогенного происхождения, просты и относительно недороги в использовании [5]. Принцип работы ФОС основан на жизнедеятельности сообществ растений и микроорганизмов прикорневой и водной зоны. Технически система представляет собой заполненный блоками фильтрующего материала котлован, дно которого выстлано водонепроницаемым материалом. Блоки в пределах системы чередуется по структуре для смены аэробных и анаэробных условий [6], чтобы создать и поддерживать гетерогенность микробиологических сообществ [5]. В ФОС используют разные типы фильтрующего материала и растительности. Роль бактерий в фито-очистке активно изучается [6], в то время как значению микроскопических грибов уделяют значительно меньше внимания.

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

В работе были использованы образцы из ФОС, расположенных в зоне тропического и умеренного климата. Образцы представляли собой донные осадки, прикорневую почву, песок и пену, до обработки хранились в замороженном состоянии. В Таиланде образцы забирали из четырёх ФОС открытого типа, которые были засажены растениями Канна (*Canna* sp.) или Рогоз (*Typha* sp.) и из небольшого пруда, с разными растениями для контроля диких, базовых групп микроорганизмов, всего 13 проб. Во Франции образцы отбирали в шести очистных комплексах с вертикальным подповерхностным потоком, все исследованные ФОС были засажены *Phragmites australis*. Во Франции отобрали 30 проб.

Почвенный посев из образцов выполнили методом выделения на твердые питательные среды из серийных разведений [7]. Провели подсчет общего числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и количества различных морфотипов колоний в каждом образце. Выделили чистые культуры, для идентификации использовали общепринятые определители. Наименования видов и систематическое положение дано по базам данных: Myco Bank (http://www.mycobank.org) и Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org).

Представленность видов оценивали по показателям относительного обилия видов. В качестве показателя разнообразия видов в работе использовали индекс разнообразия Шеннона. Для получения наглядной картины сравнения состава микромицетов из разных субстратов и местообитаний был использован

метод ординации, который позволяет расположить комплексы видов из каждого образца вдоль гипотетических осей, опираясь на данные видового состава и представленности. Для этой цели был проведен анализ методом главных компонент в программе PCO3.

В образцах из ФОС Таиланда было выявлено 45 видов микромицетов. Их количество в каждом конкретном образце варьировало от 7 до 15. Индекс разнообразия Шеннона изменялся в пределах 1,09–2,24, что говорит о достаточно высоком разнообразии и сравнимо с таковыми показателями для почв. Согласно анализу видового состава отдельных образцов из ФОС Таиланда, они распадаются на две группы. Ведущим фактором, влияющим на состав микроскопических грибов, здесь является тип растительности (*Canna* или *Typha*).

В образцах из ФОС Франции было выявлено 77 видов микромицетов. Их количество в каждом конкретном образце варьировало от 3 до 14. Индекс разнообразия Шеннона изменялся в пределах 0,63–2,67, что говорит о сильной гетерогенности образцов и достаточно высоком разнообразии, сравнимым с таковыми показателями для почв. При анализе комплексов микромицетов из образцов из ФОС Франции закономерности в группировке выявлено не было, вероятно, по причине одинакового состава растительного компонента.

Видовой состав в ФОС Таиланда и Франции существенно отличался по характеру доминирующих видов, однако есть и общие виды. Среди идентифицированных культур оказалось более 20 родов и видов (таких как *Aspergillus terreus*, *Penicillium ochrochloron*), потенциально участвующих в процессах разложения и удаления широкого спектра поллютантов. Следует отметить высокое обилие видов, способных не только развиваться на растительных остатках, но и вызывать заболевания растений (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium solani*), а также присутствие видов-токсинообразователей.

Проведен анализ видового состава культивируемых микроскопических грибов в разных зонах фитоочистных сооружений, расположенных в зонах с тропическим (Таиланд) и умеренным климатом (Франция). В результате показано, что микроскопические грибы очень разнообразны и обильны в данных типах местообитаний и, вероятно, играют существенную роль в функционировании искусственных экосистем ФОС.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-29-25027мк.*

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

## Литература

1. *Singh M., Gupta A.* Water Pollution-Sources, Effects And Control // Pointer Publishers Jaipur. 2016.
2. *Хлопянов А.Г., Пенчуков В.М., Есаулко А.Н., Шутко А.П., Лысенко И.О.* Экологические проблемы сельского хозяйства Ставропольского края // Вестник АПК Ставрополья. 2015. № 52. С. 14–20.
3. *Herrero J.L., Lozano J., Santos J.P., Suárez J.I.* On-line classification of pollutants in water using wireless portable electronic noses // Chemosphere. 2016. Vol. 152. P. 107–116.
4. *Tiyasha S., Bhagat S.* Phyto-Filtration: A New Approach of Waste Water Treatment // International Journal of Engineering and Innovative Technology. 2013. Vol. 3(2). P. 447–453.
5. *Рыбка К.Ю., Щеголькова Н.М., Алмашин Д.С., Скрипчинский А.К.* Использование фито-очистных систем для очистки от ксенобиотиков в климатических условиях России // Вода: химия и экология. 2015. № 7. С. 32–42.
6. *Рыбка К.Ю., Щеголькова Н.М., Алмашин Д.С., Скрипчинский А.К.* Фито-системы для очистки сточных вод: современное решение экологических проблем // Наилучшие доступные технологии водоснабжения и водоотведения. 2015. № 2. С. 50–59.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Звягинцев Д.Г. М.: Изд-во МГУ. 1991: 304 с.

# Микробное разнообразие верхних горизонтов водной толщи открытой части Кандалакшского залива Белого моря

*Салова В.Д., Гавирова Л.А.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва salovavd@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37918

Белое море является уникальным водным объектом с особенным гидрологическим режимом: интенсивными течениями и большим речным стоком. Однако до настоящего времени практически отсутствовали работы направленные на изучение микробных сообществ данного арктического моря. Большинство существующих работ было направлено на оценку численности и разнообразия культивируемых групп микроорганизмов, а также на изучение микробных процессов и конкретных физиологических групп. Данное исследование направлено на выявление доминирующих групп и закономерностей в изменении сообществ микроорганизмов в зависимости от глубины в верхних слоях Кандалакшского залива Белого моря.

Образцы для исследования были отобраны в открытой части Кандалакшского залива Белого моря в августе 2019 г. на глубинах от 5 до 80 м (при общей глубине 250 м). Кроме того, были измерены профили температуры и солености при помощи CastAway-CTD сканера, а также определено общее число микроорганизмов в образцах, фиксированных формалином, с помощью люминесцентной микроскопии с окраской акридиновым оранжевым. Отобранную в каждой точке воду фильтровали через нитроцеллюлозные мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, которые хранили в замороженном виде. Из образцов была выделена тотальная ДНК и получены библиотеки ампликонов V4 участка гена 16S рРНК. Библиотеки были отсеквенированы с применением Illumina MiSeq, и полученные риды были проанализированы с помощью сервиса SILVAngs (https://ngs.arb-silva.de/silvangs/) для определения относительной представленности таксонов микроорганизмов в исследуемых пробах.

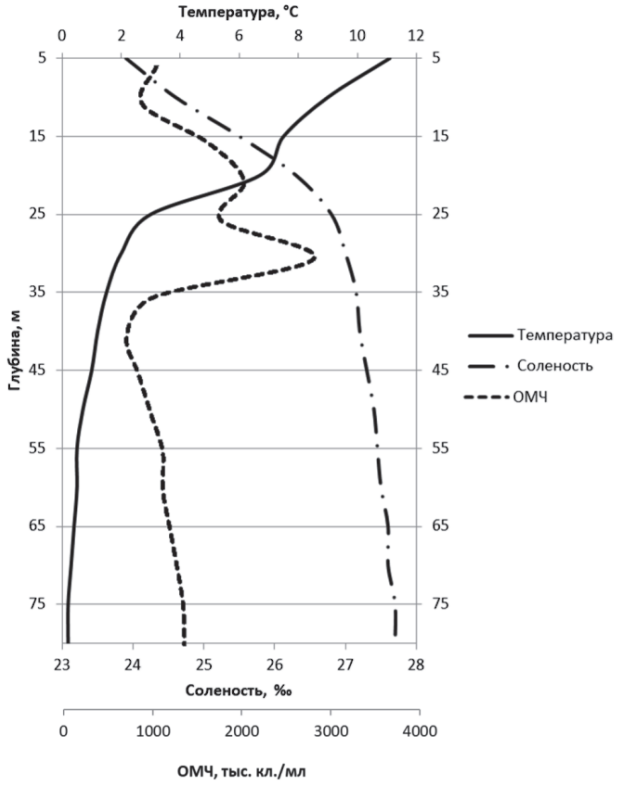



**Рис. 1.** Распределение температуры, солености и ОМЧ (общее микробное число) в водной толще Кандалакшского залива Белого моря

В ходе работы было показано, что общая численность микроорганизмов находилась в пределах от $8{,}1\times10^4$ до $2{,}9\times10^5$, причем максимальное значение наблюдалось на глубине 30 м. При этом термоклин и галоклин проходили на уровне 15–25 м (рис. 1), а фотическая зона достигала 20 м. По результатам профилирования в образцах было обнаружено 26 бактериальных и 3 архейных филумом. Во всех образцах преобладала группа *Proteobacteria* (38–57%), причем на 20 м она достигла своего максимума. На глубине 5–25 м большую долю составил класс *Alphaproteobacteria* (23–33%), а на глубине 30–80 м – класс *Gammaproteobacteria* (26%). Значительную долю класса *Alphaproteobacteria* составили группы SAR11, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*. SAR11 составляет от 9% в фотической зоне и достигает своего максимума на 25 м – 17%. *Rhodobacterales* уменьшает свою долю с увеличением глубины от 9 до 4%, когда присутствие *Rhodospirillales* увеличивается с 1 до 3%.

Наибольшую долю в классе *Gammaproteobacteria* составил порядок *Pseudomonadales* (12–22%). Другой наиболее представленный филум – *Bacteroidota* (17–6%), среди которого доминирует порядок *Flavobacteriales*, который с увеличением глубины уменьшается в 2 раза с 16 до 8%, но при этом на 35 м составляет только 2%. Кроме того, можно заметить увеличение порядка *Bacteroidales* до 2% с глубиной. Филум *Actinobacteriota* в пробах составлял от 6% до 3%, однако на глубине 35 м его представленность возросла до 36%, из которых 30% составил род *Rothia*. Цианобактерии были представлены родом *Synechococcus*, и с увеличением глубины от 5 до 25 м его доля составила от 11% до 1% соответственно, а на 30–80 м была менее 0,5%, что соотносится с уровнем фотической зоны. Представители филума *Planctomycetota* составили 2–3% от сообществ микроорганизмов во всех образцах. Увеличились с глубиной следующие представители бактериальных филумов. Доля группы *Verrucomicrobiota* составила от 2% на 5 м до 9% на 80 м и достигла своего максимума 13% на 40 м. До 80% этой группы составили представители рода *Luteolibacter*, которые являются нитрификаторами 1 фазы, а в качестве единственного источника углерода могут использовать сложные гетерополисахариды. Кроме того, по 2% от микробного сообщества на глубине 80 м составили представители групп SAR324 и *Marinimicrobia*, которые широко распространены в придонных слоях океана. Археи в образцах были представлены тремя филумами: *Thaumarchaeota*, *Thermoplasmatota* и *Halobacterota*. Наибольшую долю составили представители филума *Thaumarchaeota*, а именно рода *Nitrosopumilus*. С увеличением глубины от 5 до 80 м его доля возросла с 0,2% до 9% соответственно. *Nitrosopumilus* – нитрификатор, который является одним из ключевых участников цикла азота в морях и океанах. Он может составлять более четверти глубоководных сообществ микроорганизмов. Кроме того, в Арктических морях на зимний период его доля существенно увеличивается в верхних горизонтах.

В целом полученные данные о разнообразии и распределении микроорганизмов в водной толще Кандалакшского залива сопоставимы с существующими литературными данными об Арктических морях. Однако для получения более полного представление о сообществах микроорганизмов и их динамике необходимо проанализировать большее количество образцов из разных локаций Белого моря, отобранных с определенной периодичностью.

## Выделение и идентификация бактерий, устойчивых к тяжелым металлам, из сточных вод и ила очистных сооружений г. Тула

*Сизова О.И.[1], Переломов Л.В.[2], Кочетков В.В.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] ФГБОУ ВО Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого
osizova@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37919

В результате индустриального развития в сточные воды попадает огромное количество загрязняющих веществ, среди которых – пестициды, тяжелые металлы, антибиотики. Биологическая очистка сточных вод заключается в культивировании смешанных микробных сообществ активного ила, потребляющих компоненты сточных вод в качестве питательных субстратов, тем самым удаляя их из сточной воды. Биологическая очистка сточных вод может осуществляться как в естественных условиях на полях орошения, полях фильтрации и биологических прудах, так и в специальных сооружениях – аэротенках, окситенках, биофильтрах и т.д. Очистные сооружения, в которых используется биологическая очистка бытовых и промышленных вод от загрязнителей, представляет собой искусственную экосистему с определенными условиями и характерными для неё сложившимися биоценозами. Обезвреживание сточных вод, загрязненных неорганическими поллютантами, осуществляется микроорганизмами в процессах биосорбции и биотрансформации. Эти функции могут эффективно выполнять микроорганизмы,

будучи сами устойчивыми к загрязнителям, прежде всего тяжелым металлам и различным антибиотикам. Выделение и описание таких штаммов микроорганизмов, изучение их эколого-физиологических особенностей, оптимальных способов культивирования является крайне актуальной задачей.

Образцы воды и ила с очистных сооружений г. Тулы были отобраны в октябре 2020 г. В образцах ила и воды было определено количество аэробных микроорганизмов. Количество бактерий, выделенных из образцов, составило: ил – $2.8\times10^6$ кл./мл, вода – $2.4\times10^5$ кл./мл, метантенки – $1.6\times10^5$ кл./мл. Из образцов были выделены бактерии, устойчивые к различным тяжелым металлам: Ni, Cd, Zn, Pb, Cu. Для минимизации связывания металлов средой культивирования, была подобрана минеральная среда с минимальным содержанием солей и добавлением дрожжевого экстракта. В основном бактерии оказались устойчивы к 3–5 мМ металлов. Больше всего было выделено штаммов, устойчивых к цинку и свинцу. Среди них оказались штаммы, имеющие устойчивость к 2–3-м металлам. Из выделенных штаммов были отобраны 10 для дальнейшей идентификации.

Результаты филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК показали, что большинство выделенных устойчивых к ТМ штаммов относятся к роду *Pseudomonas* (табл. 1). Исключение составляют штаммы, устойчивые к Cu, Ni и один из штаммов, устойчивый к Pb.

*Таблица 1*

**Результаты идентификации устойчивых к ТМ штаммов**

| Номер | ТМ | Источник выделения | Принадлежность к виду |
|---|---|---|---|
| 1 | Ni | Метантенк | Serratia proteamaculans |
| 2 | Ni | Ил отстойника | Pseudomonas gessardii |
| 3 | Cd | Ил отстойника | Pseudomonas fragi |
| 4 | Cd | Вода | Pseudomonas fragi |
| 5 | Pb | Ил отстойника | Serratia proteamaculans |
| 6 | Pb | Вода | Pseudomonas fragi |
| 7 | Pb | Вода | Pseudomonas brenneri |
| 8 | Zn | Ил отстойника | Pseudomonas gessardii |
| 9 | Zn | Вода | Pseudomonas gessardii |
| 10 | Cu | Ил отстойника | Klebsiella pneumoniae |

Среди выделенных штаммов особенно интересным представляются штаммы, устойчивые к свинцу. При росте на среде со свинцом их окраска меняется, они становятся темными. Возможно, это связано с накопление/выводом из клетки ионов свинца, что требует дальнейшего изучения.

Идентифицированные устойчивые к ТМ штаммы были проверены на устойчивость к антибиотикам. Некоторые штаммы оказались устойчивы сразу к нескольким антибиотикам, что представляет несомненный интерес (табл. 2).

*Таблица 2*

**Устойчивость к антибиотикам**

| № | ТМ | Cf20 | Cf40 | Ch50 | Ch100 | Cfz20 | Cfz40 | Sm50 | Sm100 | Km50 | Mr20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Ni | | | | | + | + | | | | |
| 2 | Ni | | | + | + | + | | | | | |
| 3 | Cd | | | + | + | | | | | | |
| 4 | Cd | | | + | + | | | | | | |
| 5 | Pb | | | | | + | + | | | | |
| 6 | Pb | | | + | + | | | | | | |
| 7 | Pb | | | + | + | | | | | | |
| 8 | Zn | + | | + | + | | | + | + | + | |
| 9 | Zn | + | + | + | + | + | | | | | |
| 10 | Cu | | | | | | | | | | |

Выделенные из очистных сооружений г. Тулы бактерии, устойчивые к тяжелым металлам и антибиотикам, могут быть перспективными для применения на очистных сооружениях для биологической очистки сточных вод, загрязненных ТМ и антибиотиками.

## Динамическая микроэкология и эволюционная биология развития: подходы и перспективы

*Скобликов Н.Э.[1,2], Зимин А.А.[3]*

[1] ФГБНУ Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии
350055, г. Краснодар, пос. Знаменский, ул. Первомайская, д.4;
skoblikow@yandex.ru
[2] ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар
[3] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37920

Бурное развитие молекулярной микробиологии и микроэкологии (проекты, посвящённые изучению микробиомов и метагеномов человека и животных) привело к формированию представления о многоклеточных макроорганизмах как о «сверхорганизмах», включающих в себя не только собственные клетки и межклеточные пространства, но также и представителей микробиома, формирующих микробиоценозы его нестерильных биотопов в виде своеобразных «экстаркорпоральных органов». Наиболее полно этот взгляд получил развитие в концепции «холобионта», согласно которой макробионт («хозяин», «host») и совокупность его микробионтов – продукт коэволюции («филосимбиоза»), взаимозависимо адаптированных к существованию в определённой специфической экологической нише [1, 2]. В предельных случаях результатом такого коэволюционного симбиоза является развитие особых органов макробионта в качестве специализированных биотопов под определённые специфичные микробиомы (клубеньки растений, бактериосомы насекомых), как правило, обеспечивающих трофическую и/или репродуктивную функции.

Детализирующие исследования по изучению микробиомов и метагеномов (в первую очередь – человека) выявили как различные субпопуляционные различия в составе микробиомов различных экотопов, делая возможным характеризовать различные энтеротипы, вагинотипы *etc* [3].

Ещё более продуктивным подходом стало изучение возрастной динамики микробиомов («динамической микроэкологии»), особенно включающее сочетанное определение их бактериальных и бактериофаговых компонентов, позволяющих установить роль бактериофагов в динамике возрастной смены бактериальных штаммов [4, 5, 6].

Представляется, что такой подход особенно важен не только для установления критических периодов становления микробиома, значимых для прикладной медицины и ветеринарии, но и для понимания (и возможной реконструкции) эволюционного развития конкретных микробиомов. Примером этого может являться эволюция лактотрофии млекопитающих с формированием интестинального (и вагинального) микробиомов, основанных на определённых видах *Lactobacillus*. Не является ли возрастная (онтогенетическая) динамика микробиома отражением его эволюционной (филогенетической) динамики? Не отражает ли онтогенетическая смена таксонов в микробиоме смену эко-ниш предковых форм макробионта, приведших к изменениям его пищевой и репродуктивной стратегий?

Возможно, такой подход будет наиболее перспективен и при изучении происхождения и эволюции новых микробных патогенов, источником которых являются искусственные экосистемы, в которых получают возможность контакта макробионты – представители эволюционно и экологически далёких таксонов, практически не контактирующие в естественной среде обитания: лабораторные виварии, зоопарки, рынки с компактным содержанием живых животных. Такие искусственные экосистемы («техноцено-

зы») предоставляют возможность интенсивного и регулярного смешения различных микробиомов, результатом чего может быть перенос генетического материала между различными экологически далёкими микроорганизмами и, как следствие, появление новых штаммов, в первую очередь вирусных – как бактериофагов, так и вирусов эукариот. При этом особенно радикальным по результатам будет перенос между микробиомами двух наиболее распространённых фил теплокровных позвоночных – диапсид (птиц) и синапсид (млекопитающих), результатом чего могут служить пример появления и распространения среди млекопитающих штаммов «птичьего гриппа». Вероятно, и генезис коронавирусов – возбудителей SARS и MERS может являться примером результата взаимодействия эволюционно и экологически далёких макроорганизмов в таких искусственных экосистемах.

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

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

## Литература

1. *Margulis L., Fester R.* (1991). Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation. MIT Press. ISBN 9780262132695.
2. *Bordenstein S.R., Theis K.R.* (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. PLOS Biology. 13(8): e1002226. doi:10.1371/journal.pbio.1002226.
3. *Mancabelli L., Tarracchini Ch., Milani Ch., Lugli G.A., Fontana F., Turroni F., van Sinderen D., Ventura M.* (2021) Vaginotypes of the human vaginal microbiome. Environ Microbiol. 23(3):1780-1792. doi: 10.1111/1462-2920.15441. Epub 2021 Feb 28.
4. *Скобликов Н.Э., Забашта Н.Н., Москаленко Е.А., Зимин А.А.* Исследование смены штаммов *E.coli* кишечного микробиоценоза поросят при применении пробиотика на основе *L.paracasei* / Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Сборник научных трудов СКНИИЖ по материалам 8-й научно-практической конференции. Ч. 1 / СКНИИЖ – Краснодар, 2015. – С. 42–46.
5. *Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В, Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.* Особенности динамики титра *E.coli* нормофлоры гусят в первые семь недель жизни // III Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов/под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2016. С. 62.
6. *Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.* Особенности динамики титра колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни // IV Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов/под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017, С. 93–94.

# Морфологическая характеристика грибов-деструкторов темперной живописи при их росте на агаризованных средах

*Сорокина Е.А[1, 2], Кукушкина В.И.[2,3], Авданина Д.А.[2], Жгун А.А.[2]*

[1] Российский университет дружбы народов, г. Москва, sorokina1901@mail.ru
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва
[3] РХТУ им Д.И. Менделеева, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37921

Микроорганизмы способны расти на самых разнообразных субстратах, в том числе использовать для своего развития материалы, из которых созданы произведения изобразительного искусства. В результате происходит ухудшение их внешнего вида, вплоть до полного разрушения. В связи с этим актуальной задачей является изучение микробиологических консорциумов, способных расти на лакокрасочных материалах с целью понимания энзиматической основ их функционирования и подбора тагетированных

антисептиков, избирательно воздействующих на эти микроорганизмы и инертные в отношении самих составляющих произведения искусства материалов.

В залах Древнерусского искусства Государственной Третьяковской галереи (ГТГ, Москва, Лаврушинский переулок, 10) собрана коллекция уникальных произведений темперной живописи, которые в силу природы используемых органических материалов являются хорошим субстратом для роста различных микроорганизмов. В предыдущей работе с разрешения Т.С. Городковой, главного хранителя музейных предметов ГТГ, с экспонатов и поверхностей помещений мы отобрали свыше 100-та проб в залах Домонгольского периода (№ 56), Ростово-суздальской школы (№ 57) и Иконописи XVI–XVIII вв. (№ 61). Характеристику микробиомов в исходных пробах и соответствующих им культурах провели после метагеномного секвенирования гипервариабельных районов рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS2) на платформе MISeq Illumina, номер доступа BioProject: PRJNA606688, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA606688 [1]. Доминантными представителями плесневых грибов оказались представители семейств *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Simplicillium* и *Microascus*. Эти микроорганизмы выделили в чистые линии; показали, что они представляют потенциальную опасность для произведений изобразительного искусства ГТГ, поскольку в экспериментах с макетами на основе органических материалов, используемых в темперной живописи и научной реставрации, продемонстрировали эффективную биодеструкцию большинства материалов [1]. Затем провели серию работ по поиску эффективных антисептиков широкого спектра действия на основе алкилнуклеозидов [2], хитозана [3], фосфорсодержащих аналогов аминокислот и аналогов циклических гидроксамовых кислот, избирательно воздействующих на эти доминантные, для микробиома ГТГ, грибы. Эти используемые как тест-культуры штаммы охарактеризованы с генетической точки зрения, по ITS1 и ITS2 районам рДНК и набору некоторых дополнительных генетических маркеров, позволяющих определить видовую принадлежность. Например, участки генов кальмодулина (CaM), β-тубулина (BenA), 2-ой субъединицы РНК-полимеразы II (RPB2) использовали для идентификации аспергилл [4]; участки генов фактора элонгации трансляции 1-α (EF1a) и актина (ACT) использовали для идентификации кладоспор [5, 6]. Однако не было проведено морфологической характеристики этих новых изолятов.

*Таблица 1*

**Штаммы мицелиальных грибов, использованные в работе**

| Номер пробы | Штамм | Номера доступа GenBank | |
|---|---|---|---|
| | | SRA, BioProject | Nucleotide |
| STG-25G | *Aspergillus versicolor* | SRX7729174 | MK260015.1 |
| STG-36 | *Ulocladium* sp. AAZ-2020a | SRX7729176 | MW590700.1 |
| STG-52B | *Cladosporium halotolerans* | SRX7729178 | MK258720.1 |
| STG-57 | *Aspergillus creber* | SRX7729180 | SRX7729180 |
| STG-86 | *Aspergillus versicolor* | SRX7729182 | MK262781.1 |
| STG-93W | *Aspergillus creber* | SRX7729186 | MW575292.1 |
| STG-93B | *Cladosporium parahalotolerans* | SRX7729188 | MK262909.1 |
| STG-96 | *Simplicillium lamellicola* | SRX7729190 | MK262921.1 |
| STG-103 | *Microascus paisii* | SRX7729192 | MW591474.1 |
| STG-106 | *Aspergillus protuberus* | SRX7729194 | MK268342.1 |

В связи с этим в нашей работе изучили макроморфологические и микроморфологические особенности 10-ти штаммов мицелиальных грибов, являющихся доминантными представителями микробиома залов Живописи Древней Руси ГТГ (табл. 1). Грибные клетки культивировали на скошенной агаризованной среде Чапека-Докса (CDA; г/л: сахароза – 30, $NaNO_3$ – 2, $K_2HPO_4$ – 1, $MgSO_4{\times}7H_2O$ – 0.5, KCl – 0.5, $FeSO_4{\times}7H_2O$ – 0.01, агар – 20, pH 7.0–7.4) 10–15 сут при температуре 26 °C, собирали 0.9% р-ром NaCl, разводили до концентрации ~$1.7{\times}10^6$ КОЕ/мл. Инокулировали аликвоты 3 мл (~$5{\times}10^3$ КОЕ) на чашки Петки с агаризованными питательными средами: i) CDA; ii) MEA (мальт экстракт – 30, пептон – 5, агар – 20, pH 5.4); iii) PTA (г/л: настоянный картофель (200 г) – 4, глюкоза – 20, агар – 20, pH 5.6); iv)

CYA (г/л: сахароза – 30, дрожжевой экстракт – 5, $NaNO_3$ – 0.3, $K_2HPO_4$ – 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.5, KCl – 0.5, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001, $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0.005, агар – 20, pH 7.0–7.4). Инкубировали при температуре 26°C. Проводили определения морфологических параметров через 5–14 сут. На изучаемых средах измеряли диаметр колоний, определяли морфологию поверхности, окраску колоний и агаризованной среды. Световую микроскопию в нативных условиях проводили на микроскопе Carl Zeiss Jena (Carl Zeiss, Германия) при увеличении ×1000. Получали фотографии колоний на чашках Петри и соответствующие микрофотографии.

После инокуляции наблюдали развитие колоний, характеризующееся, типичной для мицелиальных грибов сменой двух фаз развития [7]. На первом этапе происходил радиальный рост неокрашенных колоний, связанный с вегетативным развитием гриба, трофофазой, заключается в i) получении энергии и строительного материала для обмена веществ ii) и синтезе макромолекул и липидов для увеличение биомассы [7]. В этот период колонии не имели характерных макроморфологических отличий. Далее, обычно через 7–10 дней (для всех штаммов, кроме *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36), помимо увеличения радиальных размеров колоний, наблюдали как возникновение характерных пигментных окрасок на самих колониях, так и окрашивание агаризованных сред. Поверхность колоний приобретало характерную для той или иной среды текстурированность. В ряде случаев появлялись экссудаты, представляющие окрашенные микроскопические капли на поверхностях колоний. Все это свидетельствовало о переходе организмов в идиофазу, когда начинается биосинтез характерных вторичных метаболитов, включая пигменты; колонии приобретают специфические формы, позволяющие морфологически охарактеризовать грибные штаммы на той или иной агаризованной среде [7].

*Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 проявил повышенную скорость роста, его характерная морфология проявлялась после 5–6 сут. При этом наибольшая скорость роста была на MEA и PTA, на этих средах диаметр колоний был на 55–60% больше, чем на CDA и на 10–15% больше, чем на CYA.

Для остальных штаммов морфологические характеристики определяли через 13–15 сут после инокуляции. Для *A. versicolor* STG-25G, *A. creber* STG-57 наибольший рост наблюдали на среде MEA, где диаметр колоний был на 30–45% больше, чем на других изучаемых средах. Для *A. versicolor* STG-86 наиболее подходящими средами были MEA и PTA, где наблюдали рост на 50–55% больше, чем на CDA, и 10–15% больше, чем на CYA. Для *A. creber* STG-93W лучшими средами оказались CYA и MEA, рост был лучше на 30–45%, чем на CDA, и на 10–15% лучше, чем на PTA. *A. protuberus* STG-106 рос лучше всего на CYA, что выражалось в 50–55% увеличении размера колоний по сравнению с CDA и 15–20% увеличении размера колоний по сравнению с ростом на MEA и PTA. В итоге можно сделать вывод, что среди 5-ти изолятов аспергилл из ГТГ не выявлено какой-либо наиболее предпочтительной для всех штаммов среды. Отдельные штаммы наиболее быстро развиваются на CYA, или MEA, или PTA, или на двух из этих питательных сред. Полученные результаты достаточно интересны, поскольку показано, что большинство аспергилл наиболее эффективно растут только на CYA [4]. Все штаммы аспергилл показывали замедление роста на CDA.

Для двух изучаемых штаммов кладоспор (*C. halotolerans* STG-52B и *C. parahalotolerans* STG-93B) наблюдали близкую друг к другу картину предпочтительности роста на питательных средах. Диаметр колоний этих штаммов был больше всего при культивировании на CYA и MEA, что количественно выражалось в 65–75% увеличении по сравнению с CDA и незначительном, 5–15% увеличении, по сравнению с PTA.

Дальнородственные сордариомицеты проявляли различное предпочтение к питательным средам. Так *S. lamellicola* STG-96 рос практически одинаково на всех средах, с небольшим опережением на CYA, рост на этой среде был выше на 10–15%. *M. paisii* STG-103 рос лучше всего на CDA и CYA, что выражалось в 50–60% увеличении диаметра колоний по сравнению с MEA и 25–30% увеличении диаметра колоний по сравнению с PTA. Таким образом, *M. paisii* STG-103 оказался единственным изученным штаммом, для которого агаризованная среда Чапека-Докса оказалась оптимальной для культивирования.

В нашей работе проведена морфологическая характеристика (на стандартных микробиологических средах) группы мицелиальных грибов, для которых ранее показали способность к биодеструкции материалов, из которых состоят произведения изобразительного искусства. Полученные данные дополняют общую характеристику этих микроорганизмов и могут быть полезны при разработке препаратов для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галереи от микробиологического поражения.

## Литература

1. *Zhgun A. et al.* Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library of Science (PLoS), 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
2. *Alexandrova L.A. et al.* Discovery of novel $N^4$-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // Eur. J. Med. Chem. 2021. Vol. 215.
3. *Zhgun A.A. et al.* Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15th–16th Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // Microbiology. 2020. Vol. 89, № 6. P. 750–755.
4. Species Diversity in Aspergillus, Penicillium and Talaromyces | NHBS Academic & Professional Books [Electronic resource]. URL: https://www.nhbs.com/species-diversity-in-aspergillus-penicillium-and-talaromyces-book (accessed: 27.10.2021).
5. *Carbone I., Kohn L.M.* A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes // https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051. Taylor & Francis, 2019. Vol. 91, № 3. P. 553–556.
6. *O'Donnell K. et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies // Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences, 1998. Vol. 95, № 5. P. 2044–2049.
7. *Demain A.L.* Regulation of secondary metabolism in fungi // Pure Appl. Chem. 1986. Vol. 58, № 2. P. 219–226.


# Сравнительная характеристика антибактериального действия наночастиц йода и теллура на грамотрицательные микроорганизмы (на примере *Escherichia coli*) в качестве перспективной альтернативы антимикробным препаратам


*Стрекаловская Е.И.[1,2], Звягинцева Н.Д.[1], Танцырев А.П.[2], Буковская Н.Е.[1], Балханова Т.И.[1,3]*

[1] ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет, ivanova.iem@gmail.com
[2] ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН
[3] ОГБУ МЗ «Иркутский городской перинатальный центр»



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37922


Составляя важную часть микробиоты кишечника человека и выполняя ряд полезных для организма-хозяина функций, *Escherichia coli* также занимает особое место среди возбудителей множества инфекционных заболеваний различной степени тяжести.

Сложность лечения заболеваний, причиной которых являются патогенные формы *Escherichia coli*, в настоящее время состоит не столько в количестве и разнообразии данных штаммов, сколько в возникновении устойчивости бактерии к препаратам, применяемым на постоянной основе в клинической практике. Стремительное развитие нанотехнологии предполагает собой широкий простор для создания и применения различных наноматериалов, в том числе и в качестве средств для борьбы с патогенными формами кишечной палочки, что подтверждается успешными результатами исследований учёных и врачей со всего мира.

На основании выше изложенного целью работы явилось изучение влияния наночастиц йода и теллура в матрице арабиногалактана в отношении *Escherichia coli* и составление сравнительной характеристики их антибактериальной активности.

В работе были использованы водные дисперсии наночастиц теллура (2,5%) и йода (18%) включенные в матрицу арабиногалактана (AG-TeNPs и AG-INPs) в шести концентрациях (0,1 г, 0,01 г, 0,001 г, 0,0001 г, 0,00001 г, 0,000001 г исходного вещества в 1 мл суспензии), предоставленные Иркутским институтом химии.

Антимикробный эффект наночастиц изучали с использованием 5 тест-культур *Escherichia coli* с различными биохимическими свойствами, выделенные от детей разного возраста (*E. coli* с нормальной ферментативной активностью (НФА) – 3 аутоштамма, *E. coli* со слабой ферментативной активностью

(СФА) – 1, *E. coli* с гемолитической активностью (ГА) – 1). Оценку антимикробного эффекта наночастиц проводили на плотной питательной среде – ГРМ-агар (НПО «Питательные среды», Махачкала), на которую предварительно инокулировали бактериальную суспензию с помощью тампона предварительно смоченного в микробной суспензии (0,5 по стандарту мутности МакФарланда). После чего в толще агара стерильным пробойником делали лунки диаметром 6 мм, в которые вносили по 50 мкл исследуемого наноматериала. В качестве контроля использовали стерильную воду. Все лунки были равноудалены друг от друга для исключения диффузии наночастиц в агаре. После 24 часов инкубации в термостате при 37 ºС определяли зоны задержки роста микроорганизмов вокруг лунок с различной концентрацией наночастиц.

При анализе чувствительности кишечной палочки к AG-INPs данные наночастицы проявили антибактериальную активность в отношении всех исследуемых штаммов лишь в концентрации 0,1 г исходного вещества в 1 мл суспензии и к двум штаммам *E. coli* НФА и СФА в концентрации 0,01 г/мл (табл. 1).

*Таблица 1*

**Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к AG-INPs**

| Тест-культура | Концентрации наночастиц йода в матрице арабиногалактана, г/мл | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 | 0,0000001 | Контроль ($H_2O$) |
| | Диаметр зоны задержки роста штаммов *Escherichia coli*, мм | | | | | | |
| № 5 (НФА) | 12 | 10 | – | – | – | – | – |
| № 68 (СФА) | 13 | 9 | – | – | – | – | – |
| № 84 (ГА) | 15 | – | – | – | – | – | – |
| № 85 (НФА) | 17 | – | – | – | – | – | – |
| № 600 (НФА) | 17 | – | – | – | – | – | – |

*Примечание*: «–» – отсутствие зоны задержки роста.

Можно предположить, что причинами данного результата стали большие размеры данных наночастиц (от 26 до 200 нм), что уменьшило площадь поверхности контакта с бактерией, несовместимость матрицы арабиногалактана с йодным компонентом, либо резистентность исследуемых штаммов к применяемым наночастицам.

При анализе чувствительности кишечной палочки к AG-TeNPs данные наночастицы проявили антибактериальную активность в отношении всех исследуемых штаммов в концентрации 0,1 г исходного вещества в 1 мл суспензии, 0,01 г/мл, и 0,001 г/мл. В концентрации 0,0001 г/мл антибактериальное действие AG-TeNPs было обнаружено у всех штаммов, кроме *E. coli* 84, а в концентрации 0,00001 г/мл – только у штамма *E. coli* 600 (табл. 2). Высокая антибактериальная активность AG-TeNPs по отношению ко всем исследуемым в работе штаммам *E. coli* даже при низких концентрациях вещества, предположительно, может быть связана с их небольшими, в отличие от наночастиц йода, размерами (от 22 до 30 нм) и увеличением площади поверхности контакта с бактерией.

*Таблица 2*

**Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к AG-TeNPs**

| Тест-культура | Концентрации наночастиц теллура в матрице арабиногалактана, г/мл | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 | 0,000001 | Контроль ($H_2O$) |
| | Диаметр зоны задержки роста штаммов *Escherichia coli*, мм | | | | | | |
| № 5 (НФА) | 46 | 36 | 25 | 24 | – | – | – |
| № 68 (СФА) | 45 | 35 | 17 | 11 | – | – | – |
| № 84 (ГА) | 40 | 29 | 18 | – | – | – | – |
| № 85 (НФА) | 57 | 49 | 38 | 9 | – | – | – |
| № 600 (НФА) | 41 | 36 | 30 | 19 | 9 | – | – |

*Примечание*: «–» – отсутствие зоны задержки роста.

Таким образом, AG-TeNPs могут быть рекомендованы для создания на их основе лекарственных средств против *E. coli* в качестве перспективной альтернативы уже имеющимся антимикробным препаратам. Различия в свойствах наноматериалов йода и теллура, встроенных в матрицу арабиногалактана, могут скрываться как в различии свойств самих нанокомпозитов между собой, так и в разности эффекта, оказываемого на данные наночастицы биогенной матрицей – полисахаридом арабиногалактаном.

Данный эксперимент можно считать одним из первых испытаний антибактериальной активности данных наноматериалов в матрице арабиногалактана в отношении *Escherichia coli*. Результаты говорят о необходимости дальнейшего исследования данной темы, как для нахождения возможного решения проблемы низкой антимикробной активности наночастиц йода, так и для открытия различных путей применения наночастиц теллура в клинической практике.

## Экологическая адаптация грибов рода *Alternaria* к различным биотопам яблонь

*Султанова О.О., Петерсон А.М.*

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов,
olesya.sultanova.98@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37923

Способность микроорганизмов успешно адаптироваться к обитанию в различных биотопах своих хозяев имеет большое значение в развитии инфекционных патологий растений, животных и человека. Грибы рода *Alternaria* являются как сапрофитическими обитателями окружающей среды, так и возбудителями многих патологий растений, в том числе и яблонь: листовой пятнистости, гнили поверхности плодов и сердцевинной гнили [1]. На территории Саратовской области *A. alternata* в последние десятилетия стал основным возбудителем микозного усыхания скелетных частей яблонь, в связи с чем можно говорить и о появлении стволовой формы альтернариоза яблонь [2]. При всех вышеперечисленных видах патологий выделяются очень схожие по морфологическим и культуральным свойствам штаммы рода *Alternaria*, которые большинством исследователей идентифицируются как *A. alternata.*

Целью данной работы стало выявление способности одних и тех же штаммов *Alternaria* использовать для своего развития различные биотопы яблонь и вызывать там характерные изменения в условиях *in vitro*.

Материалом для исследований послужили 9 штаммов *Alternaria,* изолированные со скелетных частей яблонь с признаками микозного усыхания в Саратовском, Энгельсском, Екатериновском, Александрово-Гайском и Новоузенском районах Саратовской области в 2018–2019 годах и 4 штамма, которые были изолированы с поражённых листьев яблонь в Энгельсском районе Саратовской области в 2020 г. Выделение штаммов грибов проводили методом отпечатка поражённых тканей яблонь на среде PDA (картофель – 20 г, агар-агар – 1,5 г, глюкоза – 2 г, вода – 100 мл). Идентификацию изолятов проводили по культуральным и морфологическим свойствам [3, 4].

В экспериментах *in vitro* были использованы плоды, листовые пластинки и фрагменты скелетных частей побегов яблонь 9 сортов разных сроков созревания: летние сорта Грушовка Московская, Белый налив, Мальт Багаевский, осенние сорта Уэлси, Жигулёвское, Беркутовское, зимние сорта Северный синап, Симиренко, Чудое. На поверхность голодного агара в чашках Петри помещали фильтровальную бумагу, на которую накладывали фрагменты тестируемых органов яблонь. Из плодов яблонь вырезали диски площадью 4 $см^2$, на которые петлёй наносили 5-суточную культуру исследуемого штамма гриба. Листовую пластинку целиком помещали в чашку Петри, на центральной жилке делали надрез длиной около 5 мм, в который петлёй вносили исследуемый микроорганизм. Использовали также фрагменты

скелетных частей побегов яблонь 2–3-летнего возраста длиной 2 см, поверхность которых механически повреждалась с помощью скальпеля (5 мм), и на место повреждения наносилась культура гриба. Контролем служили аналогичные растительные объекты с нанесённым на них физиологическим раствором. Все посевы культивировали при +28 °С во влажных камерах. Учёт проводили на 7, 14, 21 сутки.

Для сравнения полученных результатов нами была разработана шкала, позволяющая оценить степень поражения тканей яблонь *in vitro*: 0 баллов – отсутствие поражений, 1 балл – поражено не более 50%, 2 балла – поражено 50–80%, 3 балла – поражено более 80% площади тест-объекта.

В ходе проведённых исследований установлено, что при всех формах альтернариоза яблонь в посевах доминируют мелкоспоровые *Alternaria*, наиболее схожие с *A. alternata*. Штаммы *A. alternata*, изолированные с усыхающих скелетных частей яблонь, в условиях *in vitro* были способны успешно развиваться не только на тканях, с которых они были изолированы, но и на тканях листовых пластинок и плодов (табл. 1).

*Таблица 1*

**Способность штаммов *A. alternata*, изолированных с усыхающих скелетных частей яблонь, вызывать поражения тканей плодов и листовых пластинок яблонь *in vitro***

| Штаммы | Биотопы яблонь, из которых они были изолированы | Степень поражения тестируемых органов яблонь в баллах (M±m) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | скелетные части | плоды | листовые пластинки |
| *A. alternata* 2 | Скелетные части яблонь с признаками микозного усыхания | 2,0±0,3 | 1,5±0,3 | 2,2±0,1 |
| *A. alternata* 3 | | 1,8±0,2 | 1,2±0,4 | 1,3±0,1 |
| *A. alternata* 5 | | 1,8±0,3 | 0,8±0,4 | 2,1±0,2 |
| *A. alternata* 7 | | 2,0±0,3 | 0,5±0,2 | 2,3±0,1 |
| *A. alternata* 8 | | 1,5±0,2 | 1,5±0,4 | 1,1±0,2 |
| *A. alternata* 16 | | 1,5±0,1 | 1,0±0,4 | 1,2±0,1 |
| *A. alternata* 17 | | 2,0±0,2 | 1,5±0,3 | 2,3±0,1 |
| *A. alternata* 18 | | 1,5±0,3 | 1,7±0,4 | 1,3±0.1 |
| *A. alternata* 20 | | 2,3±0,1 | 1,7±0,4 | 2,8±0,2 |
| Средний балл поражения | | 1,8 | 1,3 | 1,8 |
| *A. alternata* 21 | Листовые пластинки с признаками поражения листовой формой альтернариоза | 0,5±0,1 | 1,0±0,2 | 1,3±0,3 |
| *A. alternata* 22 | | 1,0±0,3 | 1,2±0,1 | 1,3±0,2 |
| *A. alternata* 23 | | 2,0±0,1 | 1,5±0,3 | 2,3±0,3 |
| *A. alternata* 24 | | 0,7±0,1 | 1,0±0,2 | 1,3±0,3 |
| Средний балл поражения | | 1,1 | 1,2 | 1,6 |

Причём интенсивность их размножения на листовых пластинках не уступала таковой на их первоначальном субстрате. Инфицирование растительных тканей этими штаммами вызывало патологические изменения, характерные для плодовой и листовой форм альтернариоза яблонь. Наиболее агрессивным оказался штамм 20, который вызывал сильные поражения всех частей яблонь.

Штаммы *A. alternata*, изолированные с листьев яблонь, также могли вызывать поражения и других частей растений этого вида. Однако, наиболее интенсивное развитие грибов отмечалось всё же именно на листовых пластинках. Наиболее агрессивным оказался штамм 23.

Следовательно, одни и те же штаммы *A. alternata* могут переходить в пределах растения-хозяина из одного биотопа в другой и вызывать у яблонь любые из известных форм альтернариоза.

## Литература

1. *Ганнибал Ф.Б., Бильдер И.В., Ули-Маттила Т.* Виды рода *Alternaria* на яблоне // Микология и фитопатология, 2008. Т. 42. вып.1. С.18-25.

2. *Мохамед Х., Петерсон А.М., Козлова А.В.* Ассоциативные микроорганизмы побегов яблонь (Malus p. mill, 1754) в Саратовской области // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология, 2015. Т. 15. вып. 3. С. 80–84.
3. *Ганнибал Ф.Б.* Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria* // Методическое пособие. Под ред. М.М. Левитина. СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. С. 71
4. *Simmons E.G. Alternaria*. An Identification Manual. Utrecht: CBS, 2007. P. 775

# Динамика микробиологических показателей цепи Карасунских озёр города Краснодар за 2020–2021 гг.

*Супрун И.В., Мелконян К.К., Табачникова А.А., Волченко Н.Н.*

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар,
microgenbio@kubsu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37924

Карасун – в прошлом река, протекающая в пределах города Краснодар. В современном виде Карасун представляет собой цепь озёр, разделённых дамбами и участками городской застройки. Цепь озёр испытывает заметную антропогенную нагрузку, в воде ежегодно наблюдается превышение численности бактерий по санитарно-гигиеническим нормам.

Цель работы – определение и составление динамики некоторых микробиологических характеристик водоёмов города Краснодар, которые будут служить материалом для дальнейшего мониторинга.

Объектами исследования послужили образцы поверхностных и глубинных проб. Пробы вод отбиралась вблизи Кубанского государственного университета, между Комсомольским и Пашковским микрорайонами и в озере Верхнее Покровское.

В качестве микробиологических показателей были использованы общее микробное число (ОМЧ) на среде МПА, число энтеробактерий, которые выделялись на среде Эндо, и значения биохимического потребления кислорода (БПК) системой Lovibond® BD600.

Микробиологический мониторинг крайне важен для отслеживания и поддержания нормального состояния водоёмов. Мониторинг имеет большое значение для объективной оценки экологического состояния водных ресурсов. Своевременное обнаружение эпидемически опасных возбудителей, превышения допустимых значений по ОМЧ и БПК позволяет предупредить население о риске возможных инфекций, а также разработать меры для предупреждения дальнейшего загрязнения вод.

В результате исследования изучены санитарно-микробиологические характеристики цепи Карасунских озёр города Краснодар. Ни один из водоёмов согласно ГОСТ 17.1.5.02–80 по результатам БПК не соответствует микробиологическим требованиям для культурно-бытовых водоёмов, в частности для купания – превышение ПДК составляло более, чем в десять раз по сравнению с действующей нормой не более 1000 КОЕ в 1 дм$^3$. БПК исследуемых проб в большинстве случаев выходила за допустимые значения согласно СанПиН 2.1.5.980–00, однако при низких температурах данный показатель был в пределах нормы. БПК и ОМЧ оцениваются как общесанитарный признак, поэтому можно предположить, что исследуемые водоёмы богаты органическими веществами. Концентрация высеваемых энтеробактерий может косвенно свидетельствовать о фекальном загрязнении.

# Оценка применения микробиологического удобрения «Байкал ЭМ-1» на рост и развитие Pisum satium

*Сутулина Ю.А.*

ФГБОУ ВО «Курский государственный университет», г. Курск, Sutulina01@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37925

Микроорганизмы – мельчайшие живые существа – были открыты голландцем А. Левенгуком в конце XVII века. Благодаря деятельности микроорганизмов, возникла на суше основа существования растений, животных и человека – плодородная почва [2]. Биомасса микробов в почве зависит от продуктивности наземной части растительности, содержания гумуса и азота в почве, продолжительности теплого времени года, когда микроорганизмы могут активно работать.

В настоящее время актуальной задачей является комплексное изучение и внедрение в производство биотехнологий, связанных с изучением эффективных почвенных микроорганизмов, необходимых для оптимизации питания и повышения продуктивности растений.

В последние годы создано новое поколение биопрепаратов на основе эффективных микроорганизмов.

«Байкал ЭМ 1» – это препарат эффективных микроорганизмов, которые были получены из природной среды экосистемы озера Байкал. Представляет собой водный раствор, содержащий азотфиксирующие, фотосинтезирующие, молочнокислые бактерии, дрожжи и продукты жизнедеятельности этих микроорганизмов. Разлагает органику в легкодоступные и легкоусвояемые для растений формы, обогащает почву витаминами, аминокислотами и биологически активными веществами [4].

Цель настоящего исследования – оценка эффективности влияния биопрепарата на всхожесть семян, рост и развитие растений в условиях вегетационного опыта. Исследования проводились в весенний период на базе лаборатории физиологии растений Курского государственного университета. Для исследования был использованы семена гороха сорта «Амброзия».

Курс применения препарата включал 3 этапа: обработка почвы, замачивание семян, полив и опрыскивание растений. Для обработки почвы и полива 1 мл препарата разводили в 1 л воды (1:1000). Для обработки семян перед посевом разводили 1 мл препарата в 1 л воды и замачивали семена в течение 8 часов [3].

Эффективное влияние микробиологического удобрения Байкал ЭМ-1 было отмечено на первых этапах развития растений: лабораторная всхожесть семян гороха в опытных вариантах на 17% превышала данные показатели у контрольных растений.

Препарат «Байкал ЭМ-1» стимулировал увеличение морфометрических и биометрических показателей вегетативных органов растения (рис. 1).

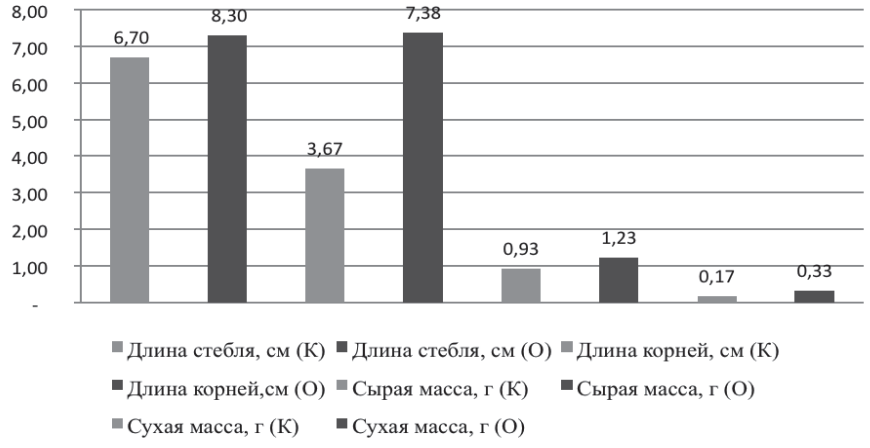



**Рис. 1.** Влияние микробиологического удобрения на ростовые качества растения *Pisum Sativum*

Высота растений в опытном варианте на 20% выше, чем в контроле. Это связано с тем, что при предпосевной обработке почвы ЭМ-препаратом в почве происходит переработка органики и обогащение биогумусом. Вследствие этого, растения сразу получают питательные вещества и полезные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые стимулируют интенсивный рост [1].

В состав «Байкал ЭМ-1» входят различные группы микроорганизмов, одними из которых являются дрожжи. Биологически активные вещества типа гормонов и ферментов, произведенные дрожжами, ускорили процессы ризогенеза: средняя длина корней опытных растений в 2 раза больше, чем в контрольных образцах. Усиленное корнеобразование стимулирует рост и развитие растения, накопление сырой массы, которая на 0,30 и 14% выше у растений, выращенных в условиях стимулятора роста и сухой массы (на 0,16 и 48% выше).

Таким образом, в результате исследования было установлено, что при обработке семян Pisum Sativum Байкалом ЭМ-1, в котором содержится большое количество анабиотических (полезных) микроорганизмов, обитающих в почве, увеличивается энергия прорастания и всхожесть. Данный стимулятор роста активирует увеличение длины стеблей и корней, их сырую и сухую массу. Полезная микрофлора в его составе влияет на все жизненно важные процессы, в том числе защищает от вредителей и инфекций. Это универсальное средство с низкой степенью токсичности, поэтому его целесообразно применять в растениеводстве.

## Литература


1. *Блинов В.А., Буршина С.Н., Шапулина Е.А.* Биологическое действие эффективных микроорганизмов: обзорная статья // Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: практика применения. – М.: ЭМ-Кооперация, 2008. – С. 30–65.
2. *Гиляров М.С.* Жизнь в почве / М.С. Гиляров, Д.А. Криволуцкий. – М.: Мол. гвардия, 1985. – 190 с.
3. *Погодаева Н.Г.* Методические рекомендации по использованию препарата «Байкал ЭМ-1» / ГНУ БЕЛнииСХ. – Белгород, 2010. – 64 с.
4. *Шаблин П.А.* Применение ЭМ-технологии в сельском хозяйстве. Сборник трудов: Микробиологические препараты «Байкал ЭМ1», «Та-мир», «ЭМ-Курунга». Москва, 2006, 23–36.


# Современная таксономия водорослей: успехи и проблемы делимитации видов


*Темралеева А.Д.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
temraleeva.anna@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37926


Основные цели таксономии – назвать, описать, отграничить от других и в итоге классифицировать виды. Таксономия водорослей прошла долгий путь длиной в несколько сотен лет, при этом её успехи сопровождались развитием инструментальной и методологической исследовательской базы, включая новые возможности световой и электронной микроскопии, усовершенствование культуральных методов, а также создания альгологических коллекций. Несомненно, что главная революция в альгологии произошла за последние десятилетия благодаря внедрению в научную практику молекулярно-генетических методов, которые привели к открытию сотен новых таксонов, в том числе криптических, установлению неожиданных филогенетических связей, позволили более надежно и объективно разграничить и классифицировать группы водорослей. Полученные результаты во многом изменили наше представление о разнообразии и распространении водорослей, обусловили переоценку диакритических признаков, поставили вопросы о факторах видоообразования, что является предпосылкой не только к фунда-

ментальному пониманию эволюции и биогеографии водорослей, но и необходимо для использования их коммерческого потенциала (Vieira et al., 2017; Leliaert et al., 2018). Было установлено, что такие признаки как морфологическая организация таллома, десмосхизис, отсутствие клеточной стенки у зооспор и другие, на которых основывалась традиционная таксономия водорослей, не могут служить надежными таксономическими маркерами, т.к. они возникали неоднократно и независимо в разных филогенетических линиях. Поэтому многие из традиционных родов водорослей, например *Chlorella*, *Tetracystis*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas*, *Chlorosarcinopsis*, *Nannochloris* и многие другие, являются полифилетичными и требуют пересмотра.

Кроме того, остались значительные пробелы в таксономии водорослей, вызванные сложностями культивирования некоторых групп и длительного поддержания культур, незначительного биогеографического охвата при изоляции, а также трудностей выделения таксономических границ ввиду отсутствия абсолютных критериев вида. В большинстве случаев описанные новые роды являются монотипными (Barcyte et al., 2017; Saber et al., 2018; Geng et al., 2021), т.е. содержат только один новый вид водорослей, что делает бессмысленным применение методов делимитации видов. Тем не менее, несмотря на сложности в определении межвидовых границ, конфликты между традиционными видами и молекулярными операционными таксономическими единицами, отсутствие аутентичных штаммов и(или) их нуклеотидных последовательностей, неполноту генетических баз данных в отношении таксономического разнообразия и географического охвата, в таксономии водорослей за последние годы произошел колоссальный прогресс. И в настоящее время общепринято проводить описание новых таксонов водорослей с использованием полифазного или интегративного подхода, включающего наравне с морфологическими, экологическими, физиологическими и ультраструктурными признаками использование различных генетических характеристик, таких как уровень генетических различий, поиск разрыва ДНК-баркода (ABGD), оценка скорости событий ветвления (GMYC, PTP), анализ вторичной структуры спейсеров ITS1 и ITS2, поиск компенсаторных замен (CBC) и молекулярных «подписей». Неподходящие ДНК-баркоды, неправильно составленная выборка таксонов без широко распространенных, филогенетически релевантных сестринских таксонов и корректной внешней группы, непроверенные фиксированные пороговые значения генетических дистанций, могут привести к несуществующей в биологической реальности классификации, в которой отдельные единицы и образуемые ими группы будут незначимы.

И в заключение, только сопоставление молекулярно-генетических данных с дополнительными свойствами таксонов позволит понять значимость различных признаков в эволюции, возможных факторов видообразования и построить естественную систему водорослей.

## Литература


1. *Barcyte D., Hodac L., Nedbalová L. Lunachloris lukesovae* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga isolated from soil in South Bohemia, Czech Republic. 2017. European Journal of Phycology 52(3): 281–291.
2. *Geng R., Wang Y., Cai F., Zhang Y., Yang P., Dai G., Li R., Yu G. Neochroococcus gongqingensis* gen. et sp. nov., a new member of coccoid cyanobacteria from a watercourse, Eastern China. 2021. Fottea 21(1): 44-52.
3. *Leliaert F., Payo D.A., Gurgel C.F.D., Schils T., Draisma S.G.A., Saunders G.W., Kamiya M. et al.* Patterns and drivers of species diversity in the Indo-Pacific red seaweed Portieria. 2018. Journal of Biogeography 45: 2299–313.
4. *Saber A.A., Fucíková K., McManus H.A., Guella G., Cantonati M.* Novel green algal isolates from the Egyptian hyperarid desert oases: a polyphasic approach with a description of *Pharao desertorum* gen. et sp. nov. (Chlorophyceae, Chlorophyta). 2018. Journal of Phycology 54(3): 342–357.
5. *Vieira C., Camacho O., Sun Z., Fredericq S., Leliaert F., Payri C., De Clerck O.* Historical biogeography of the highly diverse brown seaweed *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). 2017. Molecular Phylogenetics and Evolution 110: 81–92.

## Дрожжевые сообщества почв города Москвы

*Тепеева А.Н.[1], Глушакова А.М.[2], Качалкин А.В.[1,2]*

[1] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, Пущино, sasha211092@inbox.ru

[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37927

Проведено комплексное исследование численности и разнообразия дрожжевых грибов в городских почвах (верхний гумусовый горизонт) г. Москвы: под газонной растительностью, рядом с локальными зонами размещения бытовых отходов, в зонах теплотрасс, в придорожных зонах городских автомагистралей, а также в ненарушенных почвах на территории природных парков (Лосиный остров и Измайлово). Всего проанализировано 1084 почвенных образцов. Таксономический состав дрожжевых грибов изучали стандартным методом посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду с добавлением левомицетина. Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов региона 26S (LSU) региона рДНК. Всего в ходе работы обнаружено 86 видов дрожжей (34 аскомицетового аффинитета, 52 – базидиомицетового). Установлено, что дрожжи являются обязательным компонентом микробного населения городских почв, их численность составляет в среднем около $6\times10^3$ КОЕ/г. Показано, что в городских почвах под газонной растительностью, как и в ненарушенных почвах под лесом, доминируют базидиомицеты, тогда как в городских почвах рядом с локальными зонами размещения бытовых отходов и в почвах под лугом увеличивается доля аскомицетов. Тепловое воздействие вызывает подъем численности и разнообразия дрожжей в почве в осенне-зимний период, увеличение показателей выравненности сообществ, а также снижение доли красно-пигментированных видов. Наибольшее видовое разнообразие дрожжей характерно для городских почв, примыкающих к придомовым зонам складирования бытовых отходов. В данных зонах возрастает частота встречаемости клинически значимых видов дрожжей (*Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Diutina catenulata* и *Pichia kudriavzevii*) до 35%, а доля в сообществе достигает 17%. Установлено, что структура почвенных дрожжевых комплексов значительно изменяется в зонах воздействия автотранспортного загрязнения. При удалении от автомагистрали изменяется спектр дрожжей-доминантов, возрастает относительное обилие вида *Solicoccozyma terreus* – постоянного компонента почвенных дрожжевых комплексов природных биотопов.

## Первая ацетогенная бактерия, выделенная из арктического криопэга

*Трофимов А.С.[1,2], Рыжманова Я.В.[2], Сузина Н.Е.[2], Щербакова В.А.[2]*

[1] ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт» (ПущГеНИ);
[2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, s.trofimoff2016@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37928

Криопэги являются водными экосистемами морского происхождения. Они залегают в многолетнемерзлых толщах на глубине нескольких десятков метров в виде линз хлоридно-натриевых вод, имеют постоянные отрицательные температуры и высокую минерализацию. Криопэги изолированы от внешней среды в течение 6–120 тысяч лет, и это позволило сохранить их уникальный микробный состав и дало возможность использовать их в качестве модели для изучения микробиома древних экосистем.

Автотрофный ацетогенез и гомоацетатное брожение осуществляются анаэробными ацетогенными бактериями, осуществляющими конечный этап деструкции органического вещества, наряду с метаногенами и сульфатредукторами. Ввиду того, что восстановительный синтез ацетата из $CO_2$ термодинамически менее выгоден, чем метано- и сульфидогенез, ацетогены имеют низкую конкурентоспособность перед метаногенами и сульфатредукторами. Это объясняет их низкую численность и большие трудности в выделении чистых культур [1]. К настоящему времени известно лишь 10 видов рода *Acetobacterium*, причем 4 их них являются психрофилами [2, 3].

Объектом исследования являлся образец воды криопэга, обнаруженного в районе Бованенковского газового месторождения (70°29′00″ с.ш., 68°00′00″ в.д.) на западе центрального Ямала на глубине 120 м. Возраст криопэга – средний плейстоцен (100–12- тыс. лет), среднегодовая температура мерзлых толщ (-2)–(-4) °С. Образец воды характеризовался преобладанием хлоридов, ионов магния и кальция с общей минерализацией 14.6 г/л и pH 7.9. Отбор проб из скважины, вскрывающей криопэг, осуществляли с помощью гидрохимического барометра ПЭ 1105 в предварительно стерилизованные бутыли объемом 500 мл.

Для получения накопительных культур из образца воды криопэга использовали анаэробно приготовленную среду следующего состава (г/л): $NaHCO_3$, 0.5; $KH_2PO_4$, 0.3; $MgCl_2{\times}6H_2O$, 2.0; $NH_4Cl$, 1.0; $Na_2SO_4$, 3.0; KCl, 0.5; $CaCl_2{\times}2H_2O$, 0.15; NaCl, 2.0; резазурин 0.002; дрожжевой экстракт, 0.1; раствор витаминов по Волину, 5 мл; раствор микроэлементов, 2 мл; $Na_2S{\times}9H_2O$, 0.25. В качестве субстрата использовали $H_2/CO_2$, этанол, лактат или пропионат. Накопительные культуры инкубировали при 6 и 20 °С в течение 1 месяца. При 6 °С рост бактерий не был обнаружен. Культивирование при 20 °С привело к активному росту микроорганизмов на следующих субстратах: $H_2/CO_2$, этанол, лактат. Далее с использованием метода десятикратных разведений на среде были получены единичные колонии диаметром 1 мм, округлые, блестящие, прозрачные, беловатые, гладкие, выпуклые, с ровными краями, имели однородную структуру и маслянистую консистенцию. В результате пересева отдельных колоний, из накопительной культуры был выделен штамм, обозначенный нами как К1Ас.

Новый изолят был представлен подвижными короткими прямыми палочками со слегка заостренными концами, чаще соединенными в пары. По Граму клетки штамма К1Ас окрашивались положительно, спорообразование не наблюдалось, рост после пастеризации (70 °С, 20 минут) не обнаружен.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм К1Ас относится к роду *Acetobacterium*, его ближайшим родственником является *A. cardinolicum* WoProp$^T$ с 98.32% сходства (рис. 1). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штам-

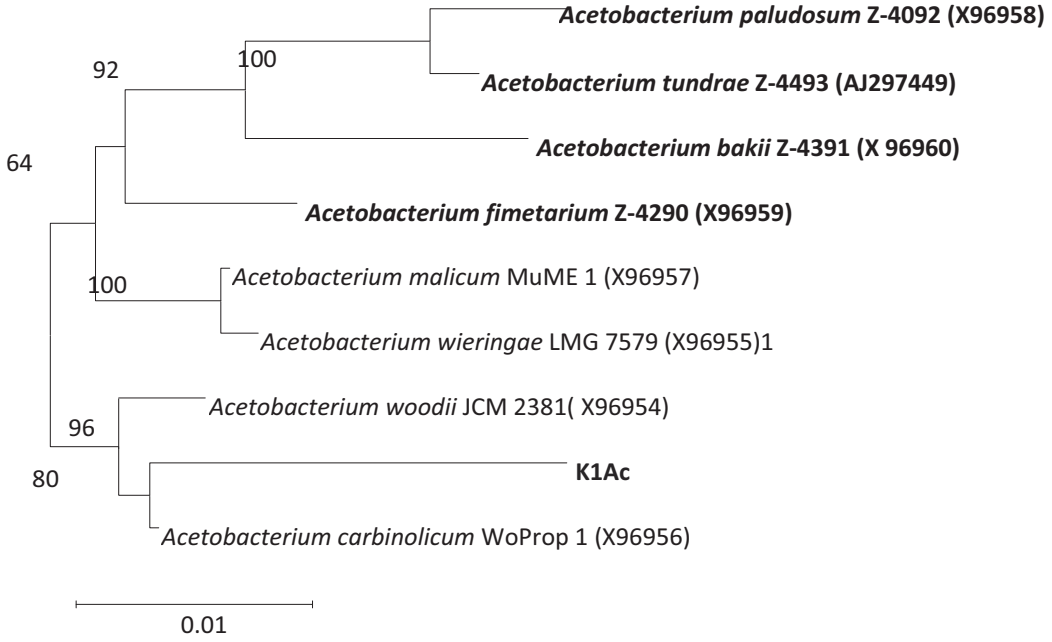



**Рис. 1**

мов K1Ac и *A. cardinolicum* WoProp$^T$, а также ряд фенотипических отличий позволяют нам предположить, что штамм K1Ac является новым видом рода *Acetobacterium.*

Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (1014 п.н.), показывающее положение штамма K1Ac среди представителей рода *Acetobacterium*. Психрофильные/психротолерантные бактерии выделены жирным шрифтом. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода "*neibour-joining*".

## Литература


1. *Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V., Petrovskaya L., Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Fattakhova R., Tiedje J.M.* Biodiversity of cryopegs in permafrost // FEMS Microbiology Ecology, 53(1):117–128.
2. *Kotsyurbenko O.R., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Zhilina T.N., Bolotina N.P., Lysenko A.M., Osipov G.A.* New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. // Arch. Microbiol. 1995; 163:29-34.
3. *Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., Osipov G.A., Nozhevnikova A.N. Acetobacterium tundrae* sp nov, a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil // Arch Microbiol. 2000, 174(6):440-7.


# Характеристика генома новой водородпотребляющей метаногенной археи из вечной мерзлоты


*Трубицын В.Э.[1], Щербакова В.А.[1]*

[1] ФИЦ ПНЦБИ, обособленное подразделение
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37929


Метаногенные археи распространены в различных экосистемах и ответственны за 70% метана, поступающего в атмосферу [1]. Несмотря на то, что их биотехнологический потенциал ещё не раскрыт полностью, они являются важными для экологии, генетики, биотехнологии, астробиологии и биохимии объектами. Гидрогенотрофный путь метаногенеза является не только наиболее распространённым среди этой группы архей [2], но и, вероятно, наиболее древним [3], а также позволяет использовать наиболее распространённые в Солнечной системе субстраты [4].

Целью работы было описание генома и анализ потенциальных биохимических путей новой водородпотребляющей метаногенной археи штамма VT.

Штамм был выделен из образца вечной мерзлоты, отобранного вблизи п. Баренцбург на территории о. Западный Шпицберген (Норвегия) в конце 2018 г. Он был получен методом десятикратных разведений на минеральной среде с добавлением формиата и $H_2/CO_2$ в качестве источников углерода и энергии. Клетки штамма представляли собой палочки 2.7–5.3×0.3 мкм, одиночные, парные, и в цепочках. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (GenBank OK037044) показал, что штамм кластеризуется с представителями рода *Methanobacterium*, ближайшим типовым штаммом является *Methanobacterium lacus* 17A1$^T$ со сходством 97.02%.

Секвенирование генома было проведено в компании Биоспарк (Троицк, Россия) на платформе Illumina NovaSeq 6000. Геномная ДНК была выделена колоночным методом с осаждением на силикагель. Исходные библиотеки подверглись очищению от адаптеров инструментом Trimmommatic v. 0.36, оценка качества библиотек проводилась в программе FastQC v. 0.11.9. Анализ библиотек с использованием программы Kaiju v. 1.7.3 показало, что в них присутствует генетический материал других организмов.

Поэтому сборка производилась в ассемблере MetaSPAdes v. 3.13.1 с последующим биннингом контигов в программе CONCOCT v. 1.1.

Выравнивание в bowtie2 v. 2.3.2 показало, что на геном штамма VT приходится 87.38% ридов, покрытие 709.51±147.94. Завершенность сборки по оценке CheckM v. 1.0.18 составила 98.8%, контаминация отсутствовала, что отвечало требованиям к MAG высокого качества [5]. Исходные библиотеки депонированы в NCBI (SRX12179610).

Для уточнения таксономического положения был использован алгоритм GTDB-tk из набора программ Kbase [6]. Самым близкородственным организмом по отношению к штамму VT был выделенный из мерзлых почв о-ва Самойловский штамм SMA-27 (ANI 95.54%, DDH 65.30%).

Геном был аннотирован в NCBI PGAP (Assembly GCA_019931065.1) [7]. Он состоял из 18 контигов общей длиной 2,662,706 н.п., N50 был равен 340,628 н.п., L50 – 3, GC состав 32.53%. Всего обнаружено 2,788 генов, из которых 2,738 CDS (2,699 из них кодируют белок). Присутствует 50 генов РНК, из которых 44 – тРНК, 5 – рРНК (2 5S, 1 16S, 1 23S). Анализ метаболических путей был выполнен с помощью инструментов KEGG BlastKOALA [8] и KEGG Mapper. Определена роль 1216 белковых последовательностей (45,1%), которые были объединены в 33 полных метаболических модуля. Геном штамма VT содержал полные генные цепи всех метаногенных путей: гидрогенотрофного (M00567), ацетокластического (M00357) и метилотрофного (M00356), но не содержал генов утилизации метиламинов. Предположительно, клетки штамма могли синтезировать некоторые витамины (тиамин, пиридоксальфосфат, кобаламин), кофакторы (CoM, F420), не могли синтезировать биотин, но имели его транспортер (bioY), были способны к фиксации $N_2$ и $CO_2$. Также были обнаружены гены, ответственные за синтез изопреноидов $C_{10}$–$C_{20}$ (M00365) и dTDL-L-рамнозы (M00793).

Таким образом, были произведены сборка и анализ генома новой водородиспользующей метанообразующей археи *Methanobacterium* sp. VT. Полученные данные могут быть полезны при оценке физиологических особенностей, а также для биоинформационных исследований выделенного штамма и рода *Methanobacterium* в целом.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-34-90087.*

## Литература

1. *Conrad R.* (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. Environ Microbiol Rep. 1. 285–292.
2. *Щербакова В.А.* Анаэробные бактерии и археи в многолетнемёрзлых отложениях Арктики: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.02.03, – М., 2018. – 249 с.
3. *Berghuis B.A., Yu F.B., Schulz, F., Blainey, P.C. et al.* (2019). Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum *Verstraetearchaeota* reveals the shared ancestry of all methanogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 116(11). 5037–5044.
4. *Taubner R.-S., Firneis M.G., Leitner J.J., Schleper C. et al.* (2015). The potential of methanogenic life in the Solar system. European Planetary Science Congress. 10. 3–4.
5. *Bowers R.M., Kyrpides N.C., Stepanauskas R., Harmon-Smith M., et al.* (2017). Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. Nat Biotechnol. 35(8). 725–731.
6. *Arkin A., Cottingham R., Henry C., Harris N. et al.* (2018). KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. Nature Biotechnology. 36. 566–569.
7. *Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V. et al.* (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic acids research, 44(14), 6614–6624.
8. *Kanehisa M., Sato Y., Morishima K.* (2015). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. Journal of Molecular Biology. 428. 10.1016/j.jmb.2015.11.006.

# Консорциум фосфатаккумулирующих бактерий из активного ила биологических очистных сооружений

*Хасанова А.А., Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Хафизова И.С., Сироткин А.С.*

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
hasanovaaigyl@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37930

Микробное сообщество активного ила является уникальной экосистемой, состоящей из ассоциаций различных филогенетических групп организмов. Особую актуальность приобретают исследования представителей биоценоза ила, участвующих в биологическом удалении соединений фосфора в процессе фосфатаккумуляции, которые представлены рр. *Accumulibacter*, *Microlunatus*, *Tetrasphaera*, *Tetracoccus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и другими (Кулаковская и др., 2014). Известно, что на механизм внутриклеточного запасания фосфат-ионов влияет ряд факторов, включая состав микробных популяций и характер их взаимодействия, а также химические показатели загрязненности сточных вод (Жмур, 2001). Для повышения эффективности указанного процесса необходимо изучение отдельных представителей фосфатаккумулирующих бактерий активного ила; внешних факторов, оказывающих влияние на физиологическую и метаболическую активность микроорганизмов; формы запасания и количественного содержания соединений фосфора в клетках.

Способность смешанных культур бактерий к внутриклеточному запасанию фосфат-ионов можно проанализировать при использовании метода низкочастотной ультразвуковой (УЗ) дезинтеграции суспензии. Механизм УЗ влияния на микроорганизмы связывают с частичным разрушением бактериальных клеток, с последующим высвобождением ряда биологически активных веществ (биополимеров, биогенных элементов – азот и фосфор, витаминов и других) (Закиров и др., 2009). Важным аспектом при применении рассматриваемого способа является выбор оптимального режима ультразвуковой дезинтеграции микробной суспензии, учитывая сложный состав внутриклеточных биомолекул и температурный нагрев.

**Целью научно-исследовательской работы** является изучение фосфатаккумулирующих бактерий сообщества активного ила и оценка их способности к внутриклеточному накоплению фосфат-ионов.

Источником выделения микроорганизмов является активный ил городских биологических очистных сооружений г. Зеленодольск Республики Татарстан, отличающийся большим видовым разнообразием: кругоресничные инфузории *Peritricha*, *Aspidisca costata, Opalina, Notommata ansata, Rotathria marcoceria, Calthypha luna, Carchesium spectabile, Epistylis plicatilis, Nematoda, Bodo* и другие.

Для получения накопительной культуры фосфатаккумулирующих микроорганизмов был реализован модельный эксперимент в лабораторной установке с периодическим варьированием степени аэрации культуральной жидкости. На первом этапе проводили культивирование образцов надиловой жидкости при температуре 20 °С на питательной среде, не содержащей источников углерода и факторов роста ($NaNO_3$ – 2 г/дм$^3$, $KH_2PO_4$ – 0,5 г/дм$^3$, $NaNO_3$ – 3 г/дм$^3$, $K_2HPO_4$ – 1 г/дм$^3$, $MgSO_4$ – 0,5 г/дм$^3$, KCl – 0,5 г/дм$^3$, $FeSO_4$ – 0,001 г/дм$^3$). Концентрация растворенного кислорода изменялась в диапазоне от 7,5 до 3,5 мг/дм$^3$ в зависимости от наличия или отсутствия дополнительной аэрации среды на разных фазах процесса культивирования. После 24 часов инкубирования накопительные культуры были высеяны на питательные среды для фосфатаккумулирующих бактерий (Хасанова и др., 2020). При микроскопическом исследовании изолятов обнаружены одиночные грамотрицательные и грамположительные кокки, грамположительные палочковидные бактерии с прямыми концами. После нескольких пассажей получен консорциум фосфатаккумулирующих бактерий РА25, в составе которого доминируют микроорганизмы *p. Bacillus* на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

На следующем этапе эксперимента осуществлялась ультразвуковая дезинтеграция клеток бактерий консорциума РА25 для оценки внутриклеточного содержания фосфат-ионов. УЗ дезинтеграцию клеток проводили на УЗДН-1 при режиме озвучивания 7 Вт/см$^2$. Суспензию микроорганизмов объемом 10 см$^3$ вносили в стеклянный стакан и подвергали обработке в течение 10, 20 и 30 с (табл. 1), измеряли темпе-

ратуру и массовую концентрацию фосфат-ионов по стандартной методике ПНД Ф 14.1:2.112-97. Контролем служила клеточная суспензия без УЗ-воздействия (0 с).

Перед УЗ обработкой проб определили начальное содержание биомассы по оптической плотности $D_{490}$ = 0,054 опт.ед., что свидетельствует о достаточном для проведения эксперимента количестве клеток в объеме суспензии.

*Таблица 1*

**Концентрация фосфат-ионов и температура суспензии фосфатаккумулирующих бактерий после УЗ дезинтеграции клеток при мощности озвучивания 7 Вт/см$^2$**

| Продолжительность, с | Массовая концентрация фосфат-ионов в суспензии, мг/дм$^3$ | Температура суспензии, °С |
|---|---|---|
| 0 | 0,53 | 25 |
| 10 | 0,82 | 28 |
| 20 | 0,82 | 30 |
| 30 | 0,83 | 31 |

Начальная концентрация фосфат-ионов в образце до обработки биомассы консорциума РА25 соответствует содержанию фосфатов в питательной среде и принимается за исходное значение, относительно которого оценивается эффективность УЗ дезинтеграции клеток. УЗ обработка суспензии клеток консорциума РА25 мощностью 7 Вт/см$^2$ в течение 10 и 20 с приводит к увеличению концентрации фосфат-ионов на 54% от начального значения. При увеличении продолжительности озвучивания проб до 30 с содержание фосфатов в среде повышается на 56%. Температура среды в ходе УЗ дезинтеграции микробной суспензии изменялась в диапазоне от 25 до 31 °С. Отмечено, что повышение температуры выше 40 °С приводит к разрушению биомолекул клетки, что приводит к погрешности измерений запасных соединений фосфора.

Таким образом, из микробного сообщества активного ила выделен консорциум фосфатаккумулирующих микроорганизмов РА25, в составе которого доминируют бактерии *p. Bacillus*. Для анализа способности выделенных бактерий к внутриклеточному запасанию фосфат-ионов применен метод ультразвуковой дезинтеграции клеток. Установлен оптимальный режим УЗ дезинтеграции клеток консорциума фосфатаккумулирующих бактерий РА25 в течение 30 с в режиме 7 Вт/см$^2$, при котором максимальное высвобождение фосфатов составило 0,3 мг/дм$^3$.

## Сравнение активности роста *Rhodococcus erythropolis* B2 при различных вариантах культивирования

*Худякова Ю.Е., Потапова Л.С.*

Кубанский государственный университет,
Биологический факультет, кафедра генетики, микробиологии и биохимии, alien3141@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37931

Остро стоящие экологические проблемы требуют разработки эффективных подходов к их решению. В том числе всегда актуальной задачей является повышение эффективности культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, что может послужить основой для последующего масштабирования их производства в пилотных масштабах. Целью нашей работы является повышение уровня эффективности культивирования бактерии *Rhodococcus erythropolis* B2 из коллекции микроорганизмов кафедры генетики, микробиологии и биохимии. Данный штамм интересен тем, что систематически применяется как биодеструктор в работах Кубанского госуниверситета по биоремедиации почв, вод и др.

Для реализации данной цели нами было осуществлено культивирование микроорганизмов в двух различных вариантах: в колбе без активного перемешивания и в разработанной нами проточной системе с турбулентным течением. Последняя представляла собой кольцевой шланг диаметром 50 мм, постоянный ток жидкости в котором обеспечивался перистальтическим насосом (LOIP LS-301), турбулентное течение было обусловлено наличием в проточной системе различного рода непроницаемых включений (фильтрационная решетка и др.). Для роста модельного микроорганизма применялась минеральная среда (вода водопроводная, нитрат аммония, однозамещенный фосфат калия, двузамещенный фосфат натрия двенадцативодный, сульфат магния семиводный), в качестве субстрата использовали сахарозу. Частота вращения перистальтического насоса – 180 об/мин.

Для определения концентрации микроорганизмов в минеральной среде проводились измерения оптической плотности бактериальных суспензий с помощью фотоэлектрического концентрационного колориметра (КФК-2МП). Начальная оптическая плотность составляла 0,067 усл.ед. В результате было показано, что спустя сутки оптическая плотность среды с культивируемыми бактериями в колбе составляла 0,127 (суточный прирост больше в 1,9 раза), а в проточной установке – 0,259 (суточный прирост в 3,9 раза). Таким образом, предлагаемая нами проточная система показала свою эффективность и может быть использована как лабораторная основа для разработки более эффективных подходов к культивированию промышленных микроорганизмов.

## «Функциональные» гены НАД (+) – зависимых формиатдегидрогеназ в таксономии метилотрофных бактерий рода Ancylobacter

*Чемодурова А.А., Решетников А.С., Доронина Н.В.*

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37932

Окисление формиата является завершающей стадией цепи реакций прямого $C_1$-окисления у аэробных метилотрофных бактерий. Известны четыре негомологичных фермента, участвующих в окислении формиата до $CO_2$ [Троценко с соавт., 2010]. $НАД^+$ – зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ), локализованная в цитоплазме, наиболее распространена у метилотрофов и играет ключевую роль в снабжении клеток энергией. Ранее этот фермент был исследован только у одного представителя рода *Ancylobacter* – *Ancylobacter aquaticus* [Nanba et al., 2003], однако, до настоящего времени значение соответствующего функционального гена в таксономической дифференциации метилотрофных бактерий не рассматривалось.

Род *Ancylobacter*, входящий в семейство *Xanthobacteraceae* порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria,* согласно LPSN (www.bacterio.net) включает 11 валидно описанных видов: *Ancylobacter aquaticus* [Ørskov, 1928; Raj, 1983], *A. rudongensis* [Xin et al., 2004], *A. polymorphus* [Xin et al., 2006], *A. vacuolatus* [Xin et al., 2006], *A. oerskovii* [Lang et al., 2008], *A. dichloromethanicus* [Firsova et al., 2009], *A. defluvii* [Poroshina et al., 2013], *A. sonchi* [Agafonova et al., 2017], *A. pratisalsi* [Suarez et al., 2017], *A. plantiphilus* [Chemodurova et al., 2020] и *A. lacus* [Chemodurova et al., 2020]. Последовательности генов 16S рРНК представителей рода *Ancylobacter* очень близки. Актуален поиск новых генетических маркеров, позволяющих осуществить дополнительную дифференциацию представителей данного рода. Цель настоящей работы – оценка эффективности использования последовательности генов НАД (+) – зависимых ФДГ в таксономии бактерий рода *Ancylobacter*. Проведен сравнительный филогенетический анализ генов НАД (+) – зависимых ФДГ аэробных метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*.

НАД (+) – зависимые ФДГ, кодируемые генами fdh2ABCD, обнаружены во всех доступных геномах аэробных метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*, аналогичные гены выявлены у других представителей семейства *Xanthobacteraceae* – родов *Xanthobacter*, *Angulomicrobium*, *Starkeya*, *Aquabacter* и *Azorhizobium.* Согласно данным филогенетического анализа, основанного на сравнении аминокислот-

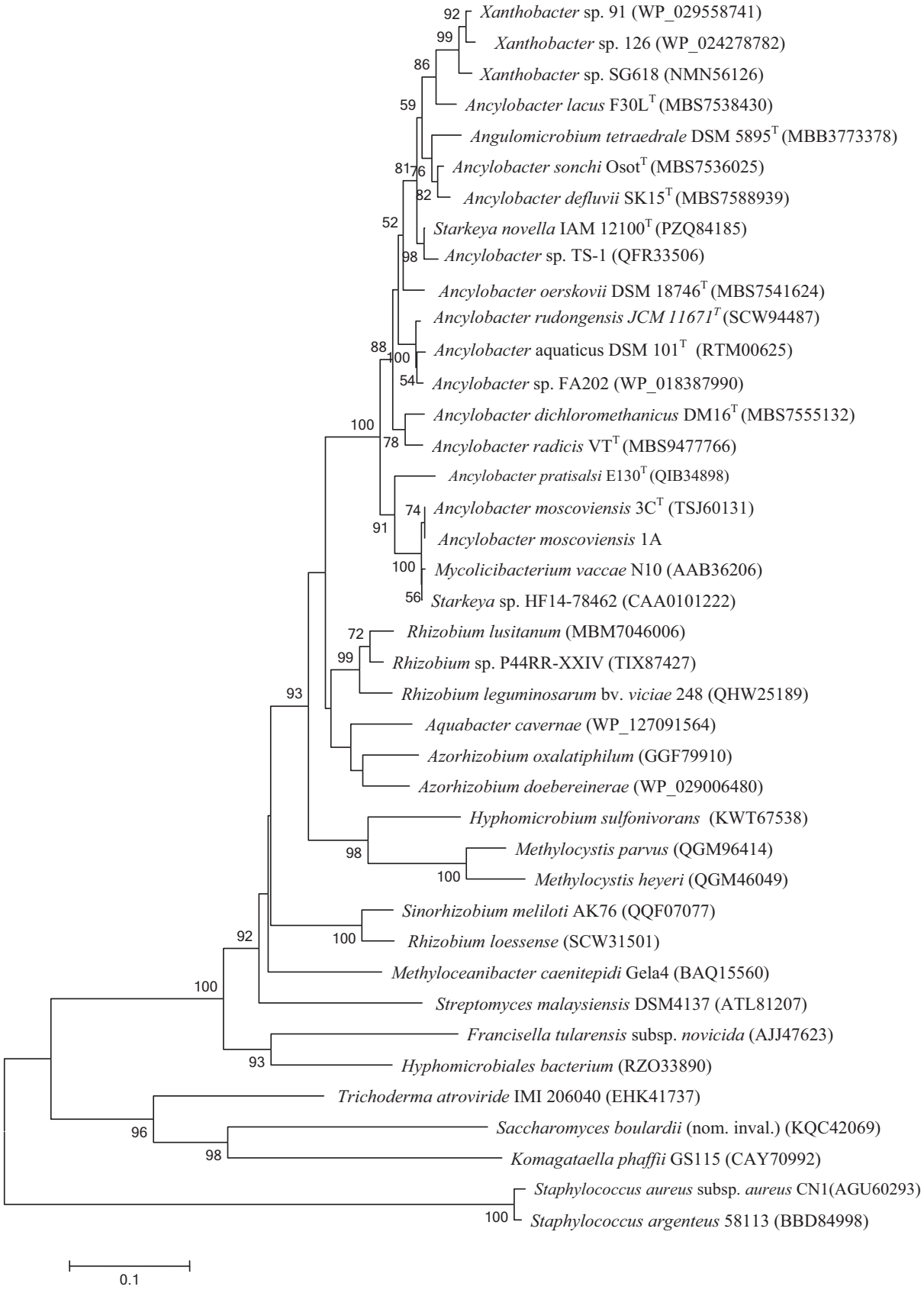



**Рис.** Филогенетическое положение представителей рода *Ancylobacter*, основанное на результатах сравнительного анализа аминокислотных последовательностей генов НАД (+) – зависимых ФДГ. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние)

ных последовательностей генов fdh2ABCD, уровень сходства между представителями рода *Ancylobacter* составляет 89–95,8% (рис.), тогда как уровень сходства между видами на основании сравнения последовательностей генов 16S рРНК составляет 97,4–100%.

Таким образом, топология филогенетического дерева НАД (+) – зависимых ФДГ коррелирует с таксономическим положением представителей семейства *Xanthobacteraceae*, проведенным на основании последовательностей генов 16S рРНК, анализ этих функциональных генов может быть рекомендован в качестве дополнительного критерия для межвидовой дифференциации бактерий рода *Ancylobacter*.

Следует отметить, что представители родов *Angulomicrobium* и *Starkeya* по генам fdh2ABCD кластеризуются вместе с другими представителями рода *Ancylobacter*. Это согласуется с результатами секвенирования генов 16S рРНК, также свидетельствующими о необходимости реклассификации родов *Angulomicrobium* и *Starkeya*.

## Система огурец обыкновенный – бахчевая тля – чёрные садовые муравьи как резервуар сапрофитических и фитопатогенных микроорганизмов

*Шьюрова А.А., Петерсон А.М.*

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», г. Саратов, arina.shyurova.98@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37933

Массовое культивирование на территории России огурца обыкновенного неизбежно связано с проблемами, вызванными паразитированием на этих растениях широкого круга вредителей, среди которых доминирующее положение занимает бахчевая тля, являющаяся переносчиком фитопатогенных вирусов и бактерий. Вместе с тем, с популяциями тлей всегда трофически связаны популяции муравьёв, которые также могут участвовать в распространении фитопатогенов [1]. Так как рассмотренные компоненты системы непосредственно взаимодействуют друг с другом в ходе случайных и пищевых взаимодействий, возможна и миграция некоторых микроорганизмов из одной экониши в другую. В связи с чем, целью работы стало выявление способности сапрофитических и фитопатогенных микроорганизмов к смене экологических ниш в системе огурец обыкновенный – бахчевая тля – чёрные садовые муравьи.

Материалом для микробиологических исследований послужили бескрылые самки бахчевой тли (*Aphis gossypii* Glov., 1877), трофически связанные с ними чёрные садовые муравьи (*Lasius niger L.,* 1758) и растения огурца обыкновенного (*Cucumis sativus* L., 1753), собранные в агроценозе в черте г. Энгельса Саратовской области. Всего было исследовано 200 особей бахчевой тли, 20 рабочих особей черного садового муравья и 20 побегов кормового растения.

Микробиологические исследования растений и насекомых осуществляли по схеме, описанной ранее [2].

Проведённые исследования показали, что видовой состав изученных ассоциаций существенно различается (таблица). С поверхности растений было выделено 5 видов бактерий и 6 видов грибов, из внутренней среды кормовых растений – 5 видов бактерий и 2 вида грибов, из организмов тлей 5 видов бактерий и 2 вида грибов, из организма муравья – 4 вида бактерий и 1 вид грибов. Из множества штаммов микроорганизмов, выделенных из растений огурца, лишь единичные виды проникали во внутреннюю среду бахчевой тли и еще меньшее их количество попадало во внутреннюю среду черного садового муравья. Грибы были сосредоточены преимущественно на поверхности кормовых растений, откуда они крайне редко попадали во внутренние среды не только насекомых, но и самих растений. Лишь *Fusarium* sp. осуществлял циркуляцию между всеми объектами исследования, однако, встречался лишь во внутренних средах насекомых, причем, в малых количествах. Наиболее пластичными компонентами системы оказались представители рода *Bacillus – B. clausii* и *B. soli.*

Наибольшим сродством микробоценозов характеризовались внутренняя среда тли и ее поверхность. Это может быть связано с тем, что в процессе питания тли выделяют пади, вместе с которыми на поверхность растений попадают микроорганизмы их пищеварительного тракта, которые в дальнейшем неизбежно попадают и на внешние покровы насекомых.

*Таблица*

**Встречаемость (%) бактерий и грибов в различных компонентах системы огурец обыкновенный – бахчевая тля – черный садовый муравей**

| Таксоны микроорганизмов | | Листья кормового растения | | Бахчевая тля | | Чёрные садовые муравьи | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | поверхность | внутренние ткани | поверхность | внутренние ткани | поверхность | внутренние ткани |
| Бактерии | *Bacillus clausii* | 100 | 100 | 70 | 75 | 20 | 20 |
| | *B. halodurans* | 65 | 35 | 10 | 5 | 0 | 0 |
| | *B. psychrodurans* | 0 | 0 | 25 | 30 | 60 | 60 |
| | *B. soli* | 100 | 100 | 100 | 100 | 70 | 80 |
| | *Erwinia carotovora** | 65 | 35 | 10 | 10 | 0 | 0 |
| | *Serratia plymuthica* | 100 | 35 | 0 | 0 | 40 | 40 |
| Грибы | *Absidia corymbifera** | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Alternaria* sp.* | 50 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Aspergillus flavus** | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Aureobasidium pullulans* | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Bipolaris spicifera** | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Fusarium oxysporum* | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *F. solani* | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *Fusarium* sp.* | 60 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 |
| | *Penicillium chrysogenum* | 65 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| | *Trichoderma* sp. | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Фитопатогенные таксоны.

Большая часть изолятов – это широко распространённые обитатели окружающей среды. Высокий уровень их распространенности предполагает наличие неких эволюционных механизмов, обеспечивающих значительную пластичность по отношению к питательным субстратам [3].

Фитопатогенные виды, наоборот, оказались более субстратоспецифичны. Основная часть фитопатогенных видов принадлежала к плесневым грибам *Absidia* sp.*, Alternaria* sp.*, Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Bipolaris spicifera*, но количество фитопатогенной микрофлоры в организмах насекомых было очень низко. Среди бактерий оказался лишь один фитопатогеный вид – *Erwinia carotovora*, который имел низкий индекс встречаемости в бахчевой тле, а в организмах черного садового муравья обнаружен не был. Однако, в тех пробах, где *Erwinia carotovora* обнаруживался, его численность достигала $10^4$ КОЕ в пробе, что говорит о его успешной адаптации к новой экологической нише.

Таким образом, бахчевая тля может выступать в качестве резервуара фитопатогенных бактерий, но практически не участвует в сохранении и передаче плесневых грибов. Черный садовый муравей может выступать лишь в роли случайного носителя фитопатогенных грибов. Бактерии-сапрофиты в исследованной системе оказались наиболее пластичными.

## Литература

1. *Новгородова Т.А*. Экологические и этологические аспекты взаимодействия муравьёв с тлями и афидофагами на разных уровнях социальной организации: дис. … док. биол. наук / Т.А. Новгородова – Новосибирск, 2015. – 306 с.

2. *Шьюрова А.А., Петерсон А.М.* Циркуляция микроорганизмов в системе огурец обыкновенный – бахчевая тля – чёрные садовые муравьи // Тенденции развития науки и образования, 2021. № 74. Ч. 1. С. 163–166.
3. *Rousk J., Baath E.* Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil // *FEMS Microbiology Ecology,* 2011. Vol. 78. Is. 1. P. 17–30.

## Систематика прокариот в постгеномную эру

*Щербакова В.А.*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, vshakola@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37934

Одна из важных конечных целей таксономии микроорганизмов состоит в разработке стабильных и надежных алгоритмов идентификации и классификации, которые были бы максимально объективны и доступны даже не имеющим специальных навыков исследователям. Учитывая огромное разнообразие прокариот в природе фундаментальной задачей для таксономии будущего является возможность создания базы данных, доступной для поиска и сравнения [1, 2]. В этом контексте геномика стала многообещающей методологией, поскольку она обеспечивает воспроизводимые, надежные и высокоинформативные средства для определения филогенетических отношений между прокариотами, что позволяет продолжить традицию естественной классификации [3].

В последнее время разработаны стандарты для использования данных секвенирования геномов в описании новых таксонов как на уровне видов, так и высших таксонов на уровне родов, семейств и порядков [4].

Роль новых подходов в идентификации прокариот можно рассмотреть на отдельной группе микроорганизмов. Метаногенные археи, ранее известные как метаногенные бактерии или метаногены, представляют собой разнообразную полифилетическую группу строго анаэробных прокариот, способных производить метан в качестве основного продукта метаболизма. Эти микроорганизмы играют большую роль в биогеохимических циклах биогенных элементов и имеют большой биотехнологический потенциал.

Прошло более трех десятилетий с тех пор, как были предложены минимальные стандарты их таксономического описания. Достижения в области технологий научных исследований и появления системы трех доменов важное значение имеет пересмотр старых критериев таксономического описания. Для этой цели в 2020 году был создан Подкомитет по метаногенным археям Международного комитета по систематике прокариот. По предложению Подкомитета сохраняется большинство рекомендованных ранее минимальных стандартов фенотипической характеристики чистых культур. Новые технологии секвенирования ДНК теперь позволяют получать полную или частичную последовательности генома для типовых штаммов и размещать ее в общедоступных базах данных. Геномные данные следует использовать для тщательного сравнения с близкими родственниками с использованием общих показателей, связанных с геномом, таких как средняя идентичность нуклеотидов и гибридизация ДНК-ДНК *in silico*. Также необходим филогенетический анализ гена 16S рРНК, который может быть дополнен анализом гена *mcr*A и филогеномным анализом с использованием множества консервативных однокопийных маркерных генов. Кроме того, теперь установлено, что чистота культуры не является существенным критерием для изучения прокариот, и допустимо описание метаногенных таксонов в статусе Candidatus с использованием геномики и других возможных способов.

Изменения минимальных критериев, предложенные членами Подкомитета, представляют строгое, но практическое руководство для таксономического описания метаногенных архей. Подобные руководства разработаны и разрабатываются для некоторых других групп прокариот, что всегда является большим подспорьем для микробиологов.

## Литература

1. *Whitman W.B.* The need for change: embracing the genome. In: Goodfellow M, Sutcliffe I and Chun J (editors). New Approaches to Prokaryotic Systematics. Methods in Microbiology, vol. 41. London:Academic Press; 2014. pp. 1–12.
2. *Rosselló-Móra R., Amann R.* Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. Syst Appl Microbiol 2015;38:209–216.
3. *Chun J., Rainey F.A.* Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. Int J Syst Evol Microbiol 2014;64:316–324.
4. *Chun J., Oren A., Ventosa A., et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 2018, 68(1), 461–466.


# Филогения прокариот как референтная структура для исследования эволюции ферментов энергетического метаболизма


*Янюшин М.Ф.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН), Пущино, yanyushin@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37935

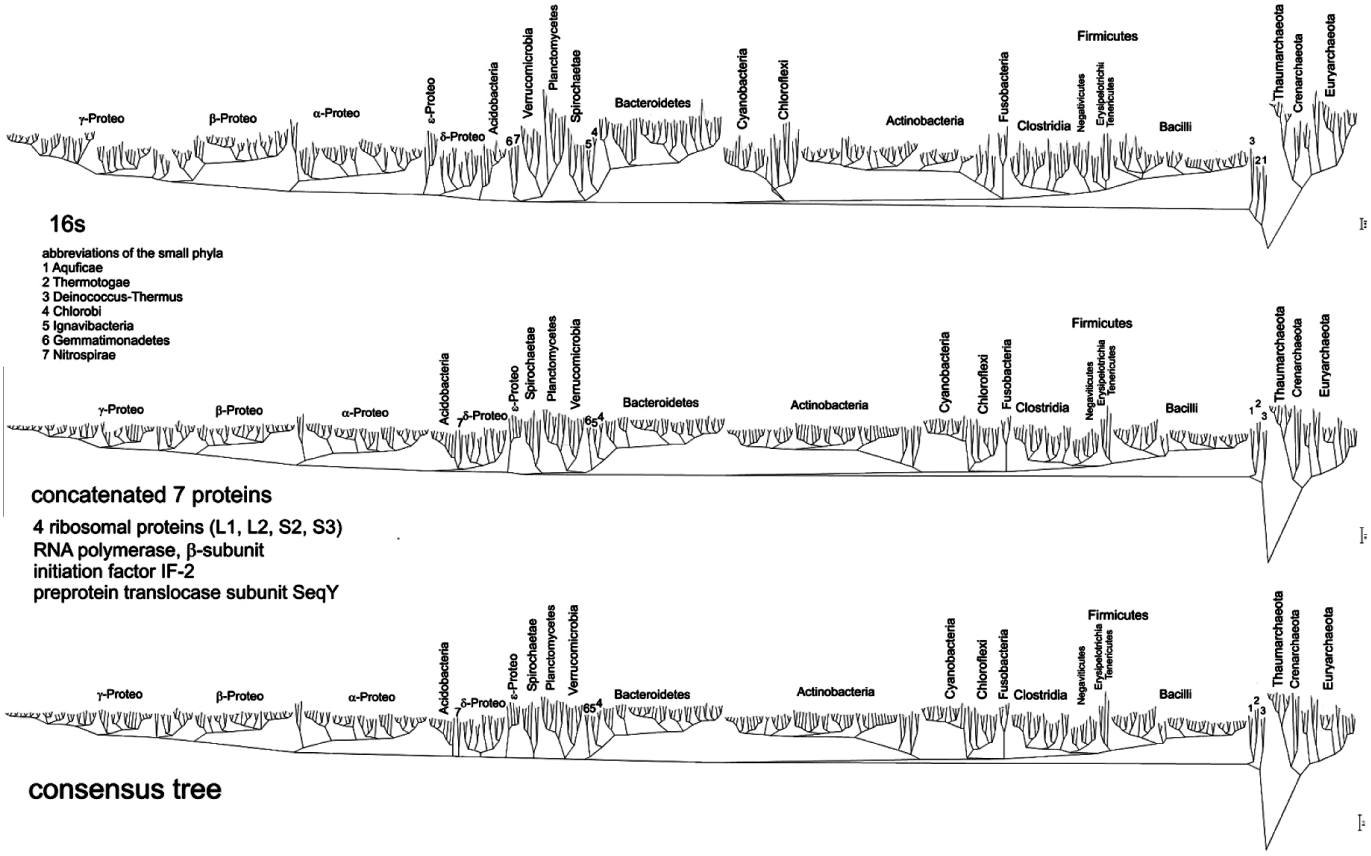

Основная задача филогенетических исследований – это создание «естественной» систематики, т.е. разбиение организмов по структурным группам, подчиненным порядку их происхождения. Для этой цели необходимы «молекулярные хронометры» – универсальные гены, присутствовавшие уже в Последнем Общем Предке и передававшиеся только вертикально – от материнской клетки дочерней. В качестве такового исключительно широко используется ген РНК малой субъединицы рибосом в силу многих полезных и удобных свойств. Важная задача общей филогении – служить референтной структурой для исследования эволюции генов и их продуктов, последовательно появлявшихся в процессе общей эволюции жизни. Все белки, функциональные и структурные комплексы, метаболические пути появились не разом, а в какие-то моменты в течение 3–4 млрд лет существования жизни. Сопоставление частных дендрограмм для генов, эволюция продуктов которых нас интересует, с надежной моделью общей филогении позволяет с той или иной степенью точности определить времена их происхождения и дальнейшую эволюцию. Нас интересует эволюция ферментов энергетического метаболизма и поэтому мы ограничиваемся филогенией прокариот, поскольку все они представлены именно прокариотами или в случае эукариот органеллами – эндосимбионтами, потомками прокариот.

В качестве молекулярных хронометров надежней использовать также и гены универсальных белков. Здесь использовано семь белков не подверженных латеральному переносу генов (четыре рибосомных белка (L1, L2, S2, and S3); бета-субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы (RNAPb); фактор инициации синтеза белка (IF-2) и субъединица препротеин транслоказного комплекса (SecY)). На основе их сцепленной аминокислотной последовательности построена дендрограмма, которая сравнивается с 16-s РНК-дендрограммой и строится некий консенсус, в котором совпадающим участкам дендрограмм придается статус определенности, тогда как структура различающихся частей эксплицитно признается как неопределенная для данного подхода.

Выбор организмов для данного исследования произведен в соответствии с заселенностью эволюционных ветвей с тем чтобы представить компактную и одновременно взвешенную картину. Для исследования взяты основные ветви архей и бактерий содержащие не менее 5000 организмов по версии Ribosomal Database Project, Release 11Update 5 September 30, 2016 (http://rdp.cme.msu.edu/)

Всего отобрано 26 ветвей (α-β-γ-proteobacteira, δ-proteobacteria, ε-proteobacteria, Actinobacteria (Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Rubrobacteria & Thermoleophilia), Firmicutes (Bacilli,

Clostridia, Erysipelotrichia, Negativicutes), Tenericutes, Bacteroidetes/Chlorobi (Bacteroidia, Chitinophagia, Cytophagia, Flavobacteriia, Sphingobacteriia, Chlorobi, Ignavibacteriae), Cyanobacteria, Acidobacteria, Aquificae, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Spirochaetes, Thermotogae, Verrucomicrobia. Aquificae и Termotogae, ветви хоть и меньшей заселенности, ключены в это число, так как занимают наиболее близкое расположение к точке расхождения архей и бактерий. Следует подчеркнуть, что данное исследование не имеет целью охватить по возможности большее разнообразие организмзов, но исследовать соотношение тех ветвей, в которых наиболее полно представлены ферменты энергетического метаболизма. По этой причине из рассмотрения исключена так называемая «Темная микробная материя», хотя обширный и разнообразный кластер, однако, представленый организмами с укороченными геномами и упрощенным энергетическим метаболизмом.




В качестве примера использования общей филогении прокариот для исследования эволюции энергетического метаболизма представлено сравнение указанной консенсусной дендрограммы и дендрограмм двух комплексов, функционально аналогичных, но имеющих разное происхождение и соответственно разное строение, а именно двух типов оксидоредуктаз осуществляющих восстановление мобильных периплазматических переносчиков электрона за счет окисления мембранных хинолов.

## Литература

1. *Yanyushin M.F.* Two types of quinol: Periplasmic e-transporter oxidoreductase. Comparison of their operons variations and distribution through bacterial phyla Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics Volume 1817, Supplement, October 2012, Page S95.

# Бактерии рода *Micrococcus*, выделенные из соляной породы Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей

*Ястребова О.В., Пьянкова А.А.*

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, olyastr@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37936

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых солей (ВМКМС) – одно из крупнейших в мире, на территории которого ведутся интенсивные работы по добыче и переработке калийных руд. Наиболее распространенными породами соляной толщи ВМКМС являются каменная соль, сильвиниты, карналлит. Каменная соль составляет основную массу ископаемых соляных месторождений и представляет собой почти мономинеральную породу, сложенную на 90–98% галитом (NaCl) [1]. Ранее из соляных пород ВМКМС были выделены бактерии родов *Dietzia*, *Kocuria*, *Micrococcus* и *Streptomyces* (класс *Actinobacteria*), а также рода *Bacillus* (класс *Bacilli*) [2, 3].

Род *Micrococcus*, являющийся типовым для бактерий семейства *Micrococcaceae* (класс *Actinobacteria*), был впервые описан Cohn F. в 1872 году [4]. Многие из типовых видов рода *Micrococcus* были изолированы из экстремальных мест обитания и растут в широком диапазоне концентраций соли, pH и температур [5, 6]. Бактерии, близкородственные виду *Micrococcus luteus* обнаружены в морских экосистемах (воде, донных отложениях, морских животных), растениях-галофитах, а также в засоленных местообитаниях, загрязненных нефтью, продуктами ее переработки (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Цель работы – характеристика бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из образцов каменной соли и карналлита соляной толщи ВМКМС.

Пять штаммов бактерий рода *Micrococcus* были выделены из образцов соляной породы, отобранной в районе промышленных разработок ВМКМС (г. Соликамск, Пермский край). Штаммы YKS63, 38-1, 69-6 и 72-1 выделены из образцов каменной соли, отобранных с разной глубины; штамм 43-1 – из образца карналлита (таблица).

*Таблица*

**Результаты филогенетического анализа штаммов рода *Micrococcus***

| Источник выделения | Штамм | Типовой штамм ближайшего родственного вида (номер в базе данных GenBank) | Сходство генов 16S рРНК, % |
|---|---|---|---|
| Каменная соль (глубина 326,9 – 327,0 м) | YKS63 | *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ (CP001628) | *99,73* |
| Каменная соль (глубина 239,7-239,8 м) | 38-1 | *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ (CP001628) | *99,57* |
| Карналлит (глубина 254,2-254,4 м) | 43-1 | *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ (CP001628) | *99,59* |
| Каменная соль (глубина 372,2-372,4 м) | 69-6 | *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ (CP001628) | *99,13* |
| Каменная соль (глубина 411,5-411,6 м) | 72-1 | *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ (CP001628) | *100* |

Результаты генотипирования исследуемых штаммов показали их отличие по BOX-ДНК профилям. На основании секвенирования и последующего биоинформационного анализа фрагментов гена 16S рРНК (739–1383 п.н.) установлено, что все пять штаммов близкородственны типовому штамму *Micrococcus luteus NCTC 2665*$^{T}$ на уровне 99,13–100%.

Исследуемые штаммы являются галотолерантными организмами и растут на агаризованной богатой среде Раймонда [3] без соли и в присутствии до 70 г/л NaCl, а штамм *Micrococcus* sp. YKS63 способен к росту при 150 г/л NaCl.

Все пять штаммов способны использовать в качестве субстрата бензойную кислоту (1 г/л), которая является продуктом метаболизма многих поли(моно)ароматических соединений. *Micrococcus* sp. YKS63

растет в жидкой минеральной среде Раймонда (30 г/л NaCl) на фенантрене, фталатах (*орто*-фталате, *мере*-фталате, дибутилфталате).

Таким образом, результаты исследований показали, что актинобактерии рода *Micrococcus* присутствуют в микробном сообществе соляной толщи (на глубинах 326,9–411,6 м) Верхнекамского месторождения. Выделенные галотолерантные штаммы являются деструкторами ароматических соединений, перспективны для дальнейших исследований с целью разработки биотехнологий ремедиации загрязненных/засоленных почв, грунтов, водных объектов.

*Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.*

## Литература

1. *Кудряшов А.И.* Верхнекамское месторождение солей // Пермь: ГИ УрО РАН, 2001. 429 с.
2. *Карташова Ю.А., Аликина И.Н., Пьянкова А.А.* Микроорганизмы пород глубинных залежей калийных и магниевых солей Верхнекамского месторождения // Сборник тезисов 20-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2016. С. 22–23.
3. *Пьянкова А.А., Кашапова Л.Э., Плотникова Е.Г.* Бактерии глубинной породы каменной соли (Верхнекамское месторождение солей) // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2019. С. 65–66.
4. *Cohn F.* Untersuchungen über Bakterien. Beitrage zur Biologie der Pflanzen Heft 1872. V. 1. P. 127–244.
5. *Prakash O., Nimonkar Y., Shaligram S., Joseph N., Shouche Y.* Response of cellular fatty acids to environmental stresses in endophytic *Micrococcus* spp. // Ann. Microbiol. 2015. V. 65. P. 2209–2218.
6. *Wieser M., Denner E., Kampfer P., Schumann P., Tindall B., Steiner U., Vybiral D., Lubitz W., Maszenan A.M.* Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 629–637.

# СЕКЦИЯ 2

# БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

## Особенности ультраструктурной организации нового изолята хищной грамположительной ультрамикробактерии рода *Microbacterium*, шт. Ltr1-эпибионта поверхностного покрова личинки тритона

*Абашина Т.Н.[1], Шорохова А.П. [1], Поливцева В.Н.[1], Носков А.Е.[2], Звонарев А.Н.[1], Сузина Н.Е.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), suzina_nataliya@rambler.ru
[2] Пущинский государственный естественно-научный институт

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37937

Микробные эпибионты кожных покровов земноводных характеризуются широким разнообразием бактериальных таксонов, способных продуцировать различные метаболиты, обладающие, в том числе, высокой антимикробной активностью, участвуя тем самым в системе защитных механизмов макроорганизма. С поверхности личинки тритона нами была выделена грамположительная бактерия, которая по своим морфологическим характеристикам и ультраструктурным признакам может быть отнесена к ультрамикробактериям (1). К таким морфологическим критериям относятся однородность размеров клеток в популяции ультрамалые объёмы клеток (менее 1 мкм$^3$), независимо от физиологических условий культивирования (рис. 1а). Филогенетический анализ на основании нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показал, что новый изолят штамм Ltr1 наиболее близок по своему филогенетическому положению к типовому штамму *Microbacterium paraoxydans*$^T$ CF36 (AJ491806), процент сходства 99,9%.

Новый изолят, штамм Ltr1, проявляет высокую антимикробную активность в отношении целого ряда грамположительных (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Deinococcus* и др.) и грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas putida*, фитопатогенной бактерии *Erwinia herbicola* и др.). Проведенные микробиологические эксперименты в сочетании с прямым наблюдением с помощью фазово-контрастной микроскопии и ультраструктурным анализом взаимодействующих бактерий в системе хищник-жертва позволили сделать вывод, что клетки штамма Ltr1 не прикрепляется для атаки к поверхности клетки-жертвы. Однако через 24 ч большая часть бактерий-жертв погибает (данные флюоресцентной микроскопии с применением реактива Живые/Мёртвые (L&D). Проведенные микробиологические эксперименты с бесклеточной культуральной жидкостью свидетельствуют о наличии секретируемого клетками диффузного агента с антимикробными свойствами. Анализ электронно-микроскопических изображений клеток штамма Ltr1 обнаружил ранее не известные пороподобные структуры в цитоплазматической мембране, имеющие сходство с crateriform pits в оболочках планктомицетов (рис. 2а). Эти структуры в клетках штамма Ltr1 могут менять свою конфигурацию в разных условиях. Так, в присутствии клеток-жертв они могут трансформироваться в кольцевидные структуры (рис. 2б). Проведенные комплексные цитологические исследования указывают на индуцибельный характер секреции клетками шт. Ltr1 антимикробно-

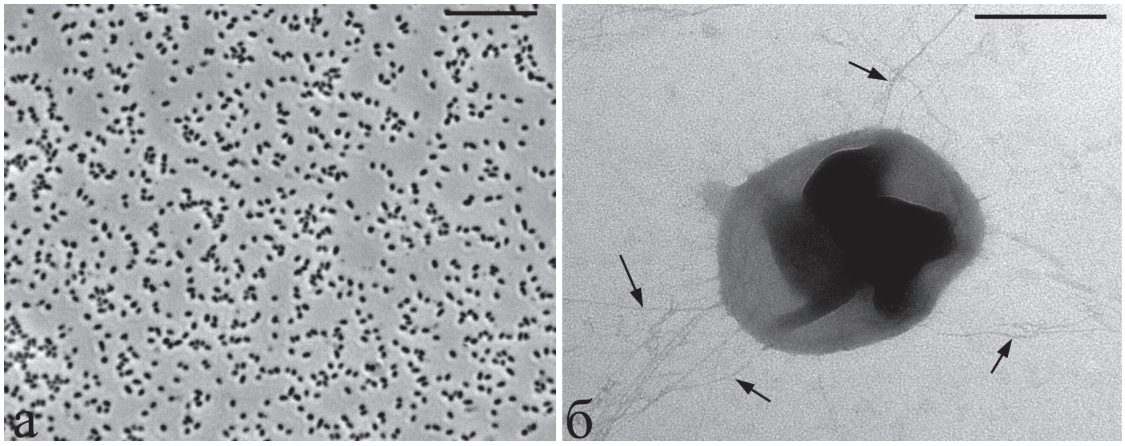



**Рис. 1.** Морфология и ультраструктурная организация клеток нового изолята, шт. Ltr1. Клетки преимущественно кокковидной, слегка вытянутой формы.
(а) Световая микроскопия, фазовый контраст; длина масштабной метки 10 мкм. (б) Электронная микроскопия, негативный контраст. Стрелками указаны фибриллярные поверхностные структуры; длина масштабной метки 0,2 мкм

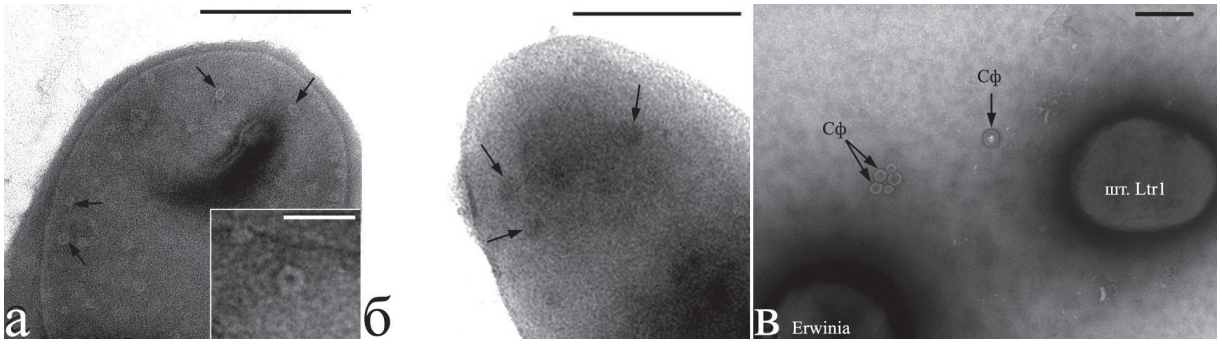



**Рис. 2.** Ультраструктурная организация клеток штамма Ltr1. Пороподобные структуры в цитоплазматической мембране клеток (а, б) (указано стрелками) и сферические образования (Сф) в межклеточном пространстве в системе хищник–жертва (в).
Электронная микроскопия. Негативный контраст. Длина масштабной метки 200 нм; на рис. 2а фрагмент – 50 нм

го агента. Электронно-микроскопический анализ позволяет предположить, что антимикробный агент инкапсулирован в оболочках сферической формы, диаметром 75–100 нм, толщина которой визуально значительно больше толщины везикул цитоплазматической мембраны (рис. 2в). Большая толщина сферических образований, возможно, обусловлена тем, что антимикробный агент локализован на внутренней поверхности сфер. Наиболее вероятным представляется, что в основе архитектуры сфер лежит цитоплазматическая мембрана.

Известно, что бактерии *Microbacterium paraoxydans* могут являться источником нозокомиальной инфекции; описаны организмы этого вида, стимулирующие рост растений; некоторые представители этого вида являются эффективными деструкторами нефти и нефтепродуктов. Нами впервые описан штамм *Microbacterium paraoxydans*, штамм Ltr1, с выраженной антимикробной активностью в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе бактериальных фитопатогенов. Обнаружен и предварительно охарактеризован новый тип мембраносвязанных пороподобных ультраструктур, динамика ультраструктурных изменений которых свидетельствует об их участии в процессе антагонистического воздействия.

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

## Литература

1. *Vitaly I Duda, Natalia E Suzina, Alexander M Boronin*. Ultramicrobacteria. eLS. 2020.

# Сверхэкспрессия полифосфатаз Ppn1 и Ddp1 повышает устойчивость клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к перекисному и марганцевому стрессам

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

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), alla@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37938

Неорганические полифосфаты (полиР) играют важную роль в адаптации клеток микроорганизмов к стрессовым условиям (Rao et al., 2009). Ранее были получены и охарактеризованы в отношении полифосфатазных активностей штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, оверэкспрессирующие полифосфатазы четыре известных на сегодня полифосфатазы дрожжей *S. cerevisiae* – Ppx1, Ppn1, Ppn2 и Ddp1 (Andreeva et al., 2019). Некоторые из этих штаммов имеют конститутивно сниженный уровень полиР, что делает их удобной моделью для исследования взаимозависимости между резистентностью клеток дрожжей к стрессовым условиям и содержанием полиР. Целью работы было сравнение содержание полиР и резистентности к окислительному, марганцевому и щелочному стрессам у штамма CRN и полученных из него штаммов, оверэкспрессирующих полифосфатазы (CRN/PPX1, CRN/PPN1, CRN/PPN2 и CRN/DDP1). В табл. 1 показано содержание полиР в клетках этих штаммов.

*Таблица 1*

**Содержание полиР (мкмоль Р/г сырой биомассы) у родительского штамма CRN и штаммов-трансформантов сверхэкспрессирующих полифосфатазы Ppx1, Ppn2, Ppn1 и Ddp1 при выращивании в среде YPD (3,8 мМ Pi) до стационарной стадии роста**

| Штамм | Кислоторастворимые полиРI | Кислотонерастворимые полиР |
|---|---|---|
| CRN | 46.3±0.07 | 29.6±0.42 |
| CRN/PPX1 | 25.7±1.85 | 29.6±0.7 |
| CRN/PPN2 | 27.3±5.6 | 18.3±4.6 |
| CRN/PPN1 | 19.1±1.2 | 25.6±0.3 |
| CRN/DDP1 | 41.0±0.5 | 42.2.3±2.1 |

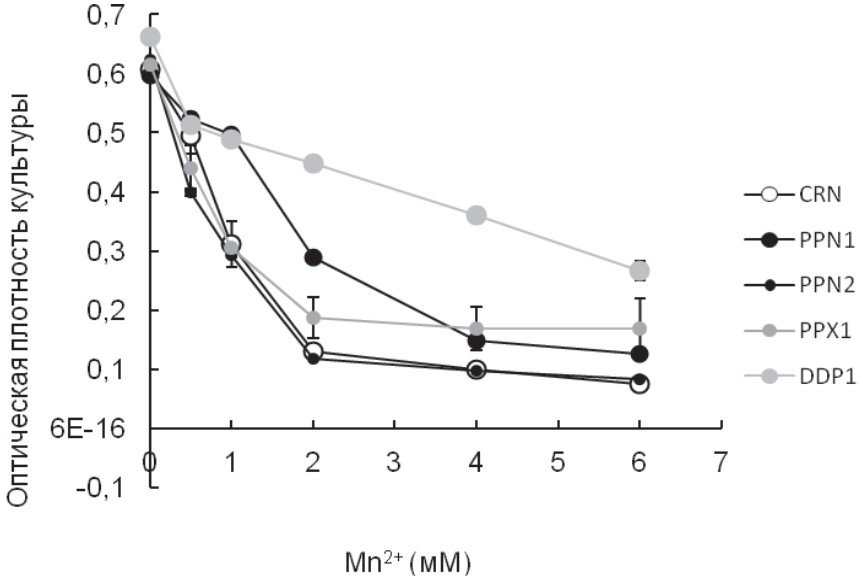



**Рис. 1.** Влияние ионов марганца на рост штаммов S. cerevisiae, сверхэкспрессирующх полифосфатазы

Сопоставление результатов определения резистентности к токсикантам (рис. 1, табл. 2) и содержания полиР (табл. 1) приводит к заключению об отсутствии прямой взаимосвязи между содержание полиР и изменениями в этой резистентности. Так штаммы CRN/PPN1 and CRN/DDP1 показали увеличенную резистентность к перекиси и марганцу, хотя у штамма CRN/PPN1 содержание кислоторастворимых полиР снижено, а у штамма CRN/DDP1 не отличалось от такового у родительского штамма. Штамм CRN/PPX1 не показал никакого увеличения резистентности, даже снижение таковой к перекиси, хотя у него в использованных в этой работе условий культивирования содержание кислоторастворимых полиР снижено так же, как и у штамма CRN/PPN1. Штамм CRN/PPN2 со сниженным содержанием как кислоторастовримых, так и кислотонерастворимых полиР был более устойчив к щелочному стрессу и перекисному стрессу. Сходство стрессовых ответов штаммов, сверхэкспрессирующих ферменты Ppn1 и Ddp1 (инозитолпирофосфат гидролазы) позволяет спекулировать о возможной роли инозитолпирофосфатов как сигнальных молекул в стрессовом ответе.

*Таблица 2*

**Концентрации перекиси, вызывающие 90% гибель клеток штаммов *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующих полифосфатазы**

| Штамм | Концентрация перекиси, мМ |
|---|---|
| CRN | 3.0 |
| CRN/PPX1 | 1.5 |
| CRN/PPN2 | 4.0 |
| CRN/PPN1 | 5.0 |
| CRN/DDP1 | 4.0 |

## Литература


1. *Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A.* (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. Ann. Rev. Biochem.,78, 605–647.
2. *Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M.* (2019) Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in Saccharomyces cerevisiae: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases. Biochimie. 163. 101-107. pii: S0300-9084(19)30166-X. doi: 10.1016/j.biochi.2019.06.001.


# Филогеномное дерево класса пезизовых (Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka), построенное по всем доступным пятидесяти двум геномным сборкам


*Арзамасцева В.О., Тепеева А.Н., Василенко О.В.*

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



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37939


Класс пезизовых (Pezizomycetes) – достаточно крупный и разнообразный монофилетический класс, одна из базальных групп в эволюционной линии мицелиальных аскомицетов. Многие представители пезизовых образуют макроскопические плодовые тела, как открытые (в том числе т.н. «дискомицеты»), так и закрытые подземные, т.н. трюфели. Среди пезизовых есть небольшое количество паразитов высших растений, в эволюционных линиях трюфелей часто встречаются микоризообразователи, но большая часть представителей класса ведут сапротрофный образ жизни на древесине, помёте животных или растительном опаде. Представители рода Morchella (сморчок), Tuber (настоящий трюфель) и некоторых других родов с подземными плодовыми телами высоко ценятся за пищевые качества и коммерчес-

ки культивируются. Есть основания полагать, что ферменты некоторых пезизовых грибов представляют биотехнологический интерес.

Наиболее полное из существующих на сегодняшний момент филогенетическое дерево класса Pezizomycetes построено лишь по пяти локусам: ITS, LSU, SSU, TEF1-a и RPB2 (Ekanayaka at al., 2018) с использованием 202 образцов. Анализ по нескольким генам информативен для межвидовых и межродовых различий, но не позволяет достоверно установить взаимоотношения между более крупными эволюционными ветвями. Представленность Pezizomycetes в работах по глобальной филогении царства грибов (Li at al., 2021; Shen at al., 2019) незначительна и составляет чуть более десятка видов на класс. Такая низкая представленность объясняется тем, что в подобных работах используется метод мультилокусного анализа с использованием генов BUSCO – набора опорных универсальных однокопийных ортологов (Seppey M., Manni E., Zdobnov M., 2019). Мультилокусный подход требует дополнительной субъективной работы по отбору подобных наборов генов из полногеномных последовательностей для каждой анализируемой группы, и чем крупнее анализируемая группа, тем меньшую выборку генов BUSCO ей удается сопоставить, что влияет на точность филогении. Отбор отдельных генов позволяет использовать для мультилокусного анализа далеко не все драфт-геномы даже относительно высокого качества, что резко снижает объём доступных данных. По нашим наблюдениям, только треть имеющихся геномов в результате бывает использована в работах такого типа.

Между тем существует хорошая идея для построения филогеномных дистантных кладограмм на основе вычисления средней нуклеотидной идентичности (average nucleotide identity, ANI). Вычисление ANI предполагает измерение общего сходства двух геномных последовательностей путём их попарного сравнения (Yoon S.H. et al., 2017). Методы, основанные на ANI, узаконены в систематике прокариот для дискриминации видов и филогенетического анализа, но их использование для эукариот пока только начинается. Геномные сборки используются целиком, «как есть», без извлечения групп генов, и – что крайне важно, – методика толерантна к низкому качеству геномных сборок (Василенко, Георгиева, 2019).

В этой работе мы используем для построения филогеномного дерева программу JolyTree (Criscuolo, 2019), основанную на алгоритмах вычисления ANI без выравнивания последовательностей mash (Ondov et al., 2016). Скрипт JolyTree вводит поправку F81 (Tamura & Kumar, 2002) и таким образом, вычисляет эволюционную дистанцию, филогенетическое построение по которой приводит к истинным эволюционным деревьям.

Мы использовали в работе все доступные в базах геномы класса пезизовых – 52 геномные сборки, представляющие 11 семейств пезизовых из общего числа 16 семейств (по данным Catalogue of life (https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/G4)). В дальнейшем мы собираемся дополнить этот объем данных недостающими семействами и расширить представленность уже имеющихся за счёт восьми живых культур пезизовых из ВКМ и порядка 500 гербарных образцов из коллекции БИН РАН. Метод JolyTree корректно строит деревья для геномов, для которых ANI, вычисленная по нуклеотидным последовательностям, не меньше 65%, – этого оказалось вполне достаточно для филогеномных расчетов внутри класса грибов. Подобное не наблюдается у прокариот, для которых характерны более длинные эволюционные дистанции между таксонами с рангом выше видового.

Парадоксально, но мы констатируем, что филогеномный метод анализа при помощи скрипта JolyTree больше применяется для прокариот, хотя имеет большие возможности для филогеномики эукариот, в частности, грибов.

Данный текст представлен на правах первой русскоязычной версии препринта. Вторая расширенная версия будет на портале bioRxiv.

*Работа опубликована в рамках инициативного проекта RPRC-21-01 ФИЦ ПНЦБИ РАН.*

## Литература

1. *Ciufo et al.* Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68: 2386–2392. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809
2. *Criscuolo A.* (2019) A fast alignment-free bioinformatics procedure to infer accurate distance-based phylogenetic trees from genome assemblies // Research Ideas and Outcomes. 5: e36178. 2019. https://doi.org/10.3897/rio.5.e36178
3. *Ekanayaka A.H., Hyde, K.D., Jones, E.B.G. et al.* Taxonomy and phylogeny of operculate discomycetes: Pezizomycetes. Fungal Diversity. 2018. Vol. 90 (1). 161-243. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0402-z

4. *Li Y., Steenwyk J. L., Chang Y., Wang Y. et al.* A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi // Current Biology. 2021. Vol. 31 (8). 1653-1665. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074
5. *Ondov, B.D., Treangen, T.J., Melsted, P. et al.* Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash // Genome Biol 2016. Vol. 17 (132). https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x
6. *Shen X.X., Steenwyk J.L., LaBella A.L., Opulente D.A et al.* Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota//Science advances. 2020. Vol. 6 (45). https://doi.org/10.1126/sciadv.abd0079
7. *Seppey M., Manni M., Zdobnov E.M.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation28 completeness //Gene prediction. 2019. New York: Humana. 227-245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
8. *Tamura K., Kumar S.* Evolutionary Distance Estimation Under Heterogeneous Substitution Pattern Among Lineages // *Molecular Biology and Evolution. 2002.* Vol. 19 (10). 1727–1736. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003995
9. *Yoon S. H. et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity // Antonie Van Leeuwenhoek. 2017. Vol. 110 (10). 1281-1286. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4
10. *Василенко О.В., Георгиева З.Д.* О проблеме инвариантности межгеномной дистанции у прокариот. // VI Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: (сборник тезисов) – Москва: Издательство Вода: химия и экология, 2019. С. 72-75. https://doi.org/10.18334/ibpm2019_72-75

## Цитотоксические свойства киллер-токсина дрожжей *Yarrowia lipolytica*

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

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37940

Взаимодействие и конкуренция микроорганизмов в экосистемах определяется большим набором факторов, основными из которых являются биосинтез и выделение в окружающую среду разнообразных метаболитов с антимикробными свойствами, среди которых особое внимание привлекают низкомолекулярные пептиды и киллер-токсины. В настоящее время киллерная активность обнаружена у бактерий [1]; головневых грибов [2, 3]; миксомицетов [4] и дрожжей [5].

Изучение микоцинов актуально, поскольку они успешно применяются для борьбы с аборигенными штаммами в пищевой промышленности и виноделии, для производства антибиотиков, а также для биоремедиации окружающей среды [4, 5] и т.п.

Ранее из *Yarrowia lipolytica* Y-2378 нами был выделен антимикробный пептид. Выделенный токсин подавлял рост бактерий, дрожжей и грибов [6].

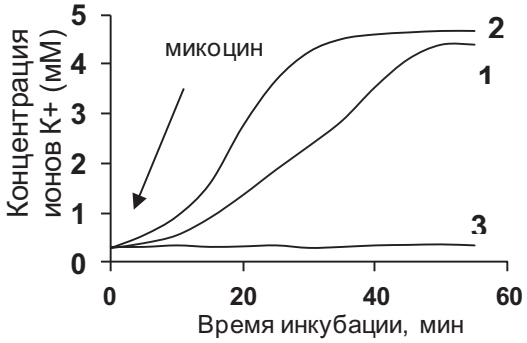
В настоящей работе представлены данные изучения механизма действия киллер-токсина из *Y. lipolytica* Y-2378.

Полагают [7], что киллер-токсины повреждают цитоплазматические мембраны путем образования пор, что приводит к снижению внутриклеточного pH и высвобождению некоторых низкомолекулярных соединений из клеток.

Мы показали, что киллер токсин инициирует выход ионов калия ($K^+$) из клеток бактерий (рис. 1) и снижает их мембранный потенциал (рис. 2), что вызывает полную деэнергизацию клеток.

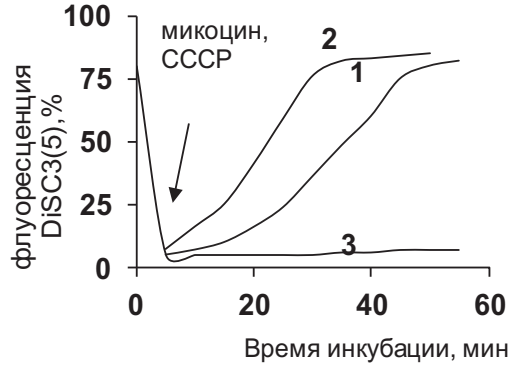
Трансмембранное образование пор не является единственным механизмом уничтожения микробов. Существует предположение, что транслоцированные пептиды могут активировать каспазы, что сопровождается выходом цитохрома *c* из мембраны и нарушением переноса электронов по дыхательной цепи. При этом возможно образование активных форм кислорода (АФК).

Действительно, как показано на рис. 3, инкубирование клеток в присутствии киллер-токсина приводило к образованию АФК.



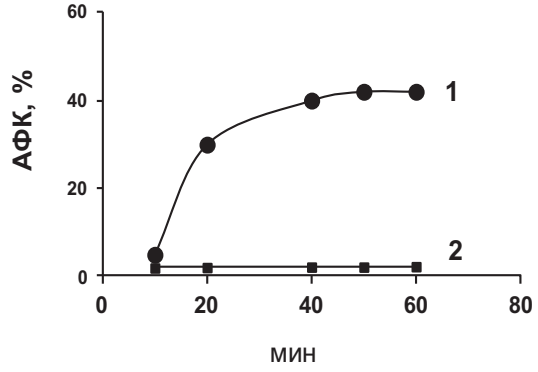

1. Клетки (1,2 мг/мл) + киллер-токсин (0,01 мг/мл),
2. Клетки + СССР (5 мкМ),
3. Клетки без добавок (контроль)

**Рис. 1.** Влияние киллер-токсина и разобщителя СССР (карбонилцианид-хлорфенил гидразон) на выход ионоа калия ($K^+$) из клеток бактерий *B.subtilis* ATCC 6633.
Выход ионов калия ($K^+$) из клеток бактерий регистрировали с помощью $K^+$ селективного электрода




1. Клетки (1,2 мг/мл.) + киллер-токсин (0,01 мг/мл),
2. Клетки + СССР (5 мкМ),
3. Клетки без добавок (контроль)

**Рис. 2.** Влияние киллер-токсина и разобщителя карбонил цианид-хлорфенил гидразона (СССР) на трансмембранный потенциал клеток бактерий *B. subtilis* ВКМ 720




1. Клетки (1,2 мг/мл.) + киллер-токсин (0,01 мг/мл);
2. Клетки без добавок (контроль)

**Рис. 3.** Влияние киллер-токсина на образование АФК в клетках *B. subtilis* ATCC 6633.
Образование АФК оценивали по люминесценции красителя дигидро-2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата при 480–520 нм

Таким образом, антибиотическое действие киллер-токсина обусловлено:
– снижением мембранного потенциала,
– выходом из клеток ионов калия,
– увеличением образования активных форм кислорода.

## Литература

1. *Konisky J.* // Annu. Rev. Microbiol. 1982. V. 36. P. 125–144.
2. *Koltin Y., Day P.R.* // Appl. Microbiol. 1975. V. 30 № 4. P. 694–696.

3. *Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J. Kre1p,* // Cell. 2002. V. 108. № 3. P. 395–405.
4. *Magliani W., Conti S., Travassos L. et al.* // FEMS Microbiol Lett. 2008. V. 288 № 1. P. 1–8.
5. *Mannazzu I., Domizio P. et al., Comitini F., Budroni M., Ciani M.* Crit Rev Biotechnol. 2019. 39(5):603–617.
6. *Бирюкова Е.Н. Аринбасарова А.Ю. Меденцев А.Г.* Сборник VI Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Москва. Из-во Вода. Химия и экология. 2-6 декабря 2019 – С. 188–190. ISSN 978-5-990-9335-3.
7. *Marquina D., Santos A. and Peinado J.M.* // International Microbiology. 2002. V. 5. P. 65–71.

# Дыхательная цепь грибов и дрожжей как мишень действия стресс-факторов

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

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37941

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Выживание и конкурентоспособность по отношению к другим видам обеспечивается «запуском» специальных механизмов, включающих синтез ферментов, а также защитных или сигнальных метаболитов.

Действие стрессоров на внутриклеточные мишени представляет большой интерес в связи с исследованием адаптационных механизмов и их роли в эволюционных процессах.

При изучении адаптации грибов родов *Fusarium*, *Trichoderma* и дрожжей *Yarrowia lipolytica* к различным стрессовым условиям показано, что одной из мишеней действия стрессоров является дыхательная цепь.

В настоящей работе рассмотрены возможные механизмы действия различных стресс-факторов на электротранспортную цепь.

Было показано, что в присутствии стрессоров резко снижется потребление кислорода клетками – подавляется перенос электронов по дыхательной цепи при окислении митохондриями различных субстратов, что приводит к нарушению энергетического обмена.

Следует отметить многообразие обнаруженных митохондриальных дисфункций: изменение митохондриальной концентрации $Ca^{2+}$ [1], нарушение окислительного фосфорилирования за счет ингибирования сукцинат дегидрогеназы [2], выход цитохрома *c* из митохондрии в цитозоль и др. [3].

Возможно также непосредственное ингибирование цепи переноса электронов на любом участке – от убихинона до цитохромоксидазы, причем, может существовать несколько точек ингибирования одним и тем же стрессором. Так, кинетические исследования показали, что госсипол ингибирует два фрагмента дыхательной цепи митохондрий *Y. lipolytica* с разной интенсивностью: 1) между коэнзимом *Q* и цитохромом *b*; 2) на уровне экзогенной NADH – дегидрогеназы [4, 5].

Установлено, что в стрессовых условиях происходит снижение мембранного потенциала, а также выход из клеток ионов калия, что приводит к деэнергизации микроорганизма [5–7].

Повреждение дыхательной цепи прямо или косвенно приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) (на уровне убихинона), тем самым создаются условия окислительного стресса [5–8].

Было обнаружено также, что в качестве стрессового ответа происходит снижение внутриклеточного содержания АТФ [4, 9], показателя энергетического потенциала клетки.

Важным аспектом изучения стресс-реакций является изменение внутриклеточного содержания цАМФ, как одной из сигнальных молекул [8, 9]. Оказалось, что после воздействия на клетки любого из используемых стресс-факторов последовательно происходит сначала кратковременное увеличение, а потом снижение концентрации этого нуклеотида до уровня, ниже исходного, в то время как его содержание в отсутствии стрессоров (контроль) практически не изменялось.

Уровень цАМФ в клетке определяется соотношением активностей аденилатциклазы (синтез цАМФ) и фосфодиэстеразы (распад цАМФ). Можно предположить, что увеличение уровня цАМФ в первые минуты после воздействия на клетки стрессоров обусловлено увеличением активности аденилатциклазы, что приводит к снижению внутриклеточного pH, падению активности аденилатциклазы и стимуляции фосфодиэстеразы.

Согласно литературным данным [10] действие цАМФ (с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы А) на стрессовые гены связано с наличием в этих генах регуляторной последовательности CREs (cAMP-responsive elements). У эукариотных микроорганизмов эта последовательность действует как «выключатель» гена. При снижении уровня нуклеотида вследствие уменьшения активности протеинкиназы А и активации фосфорилазы происходит дефосфорилирование белка CREB, который диссоциирует от элемента CRE, в результате чего происходит активация транскрипции генов. Учитывая особенности действия цАМФ у дрожжей как негативного фактора транскрипции ряда генов, можно предположить, что именно снижение уровня этого метаболита приводит к активации защитных механизмов.

Установлено, что в качестве адаптивного ответа в клетках грибов и дрожжей происходит одновременное увеличение активностей антиоксидантных систем, тем или иным образом участвующих в детоксикации АФК [9].

С помощью ингибиторного анализа установлено, что еще одним компонентом сложного стрессового ответа является «включение» альтернативного пути переноса электронов – цианидрезистентной оксидазы, которая ответвляется от основной фосфорилирующей дыхательной цепи на уровне убихинона [4, 9]. Основная функция альтернативной оксидазы состоит в поддержании окислительной активности клеток и сохранении способности к синтезу АТФ в первом пункте сопряжения на уровне эндогенной НАДН-дегидрогеназы.

Вопрос о физиологической роли цианидрезистентной оксидазы является одним из ключевых при изучении энергетики эукариотных микроорганизмов.

В ряде случаев появление альтернативной оксидазы, наряду с другими стресс-белками, не всегда связано с участием в защитном процессе. Она может синтезироваться и присутствовать в митохондриях наряду с полноценной цитохромной дыхательной цепью. Такая ситуация возможна, когда воздействие стрессового фактора на клетки не связано непосредственно с нарушением переноса электронов по цитохромному пути, например при лимитировании роста *Y. lipolytica* глюкозой. В этих условиях цианидрезистетный путь окисления не принимает участия в дыхании клеток.

Изменения на уровне энергетического и антиоксидантного статусов клетки, обусловленные нарушением переноса электронов по дыхательной цепи – увеличение генерации АФК, снижение содержания АТФ и цАМФ, снижение трансмембранного потенциала – коррелируют с показателем выживаемости и изменением ультраструктуры клеток в стрессовых условиях [8, 9, 11]. Обнаружено увеличение размеров митохондрий, увеличение размеров и количества пероксисом, располагающихся по периферии цитоплазмы. Как часть общего защитного ответа показано также образование новых клеточных структур: полифосфатных включений, поверхностных гранул, содержащих кремний, мембранных везикул.

## Литература


1. *Martinez F., Milan R., Espinosa-Garcia T., Pardo J.P.* // The antifertility agent, gossypol, releases calcium from rat liver mitochondria. // Anticancer Res. – 2002. – V. 22. – P. 1491–1496.
2. *Hou D.X., Uto T., Tong X., Takeshita T., Tanigawa S., Imamura I., Ose T., Fujii M.* // Involvement of reactive oxygen species-independent mitochondrial pathway in gossypol-induced apoptosis. // Arch. Biochem. Biophys. – 2004. – V. – 428. – P. 179–87.
3. *Oliver C.L., Miranda M.B., Shangary S., Land S., Wang S., Johnson D.E.* (-)-Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl-2- and Bcl-X(L)-mediated apoptosis resistance. // Mol. Cancer. Ther. – 2005. – V. – 4. – P. 23–31.
4. *Medentsev A.G., Arinbasarova A.Y., Golovchenko N.P., Akimenko V.K.* Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. // Fems Yeast Research. – 2002. – V. 2. – P. 519–524.
5. *Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G., Krupyanko V.I.* Gossypol inhibits electron transport and stimulates ROS generation in *Yarrowia lipolytica* mitochondria // Open Biochem J. – 2012 – P. 611–615.
6. *Jarolima K., Woltersa K.* The secondary *Fusarium* metabolite aurofusarin induces oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human colon cell. // Toxicology Letters. – 2018. – V. 284. – P. 170–183.

7. *Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г.* Низкомолекулярный антимикробный пептид *Trichoderma* cf. *Aureoviride* Rifai BKMF-4268D // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 2. – С. 9–12.
8. *Arinbasarova A., Machulin A., Biryukova E., Sorokin V., Medentsev A. and Suzina N.* Structural changes in the cell envelope of *Yarrowia lipolytica* yeast under stress conditions // Canadian Journal of Microbiology – 2018. – V. 64 – P. 359–365.
9. *Arinbasarova A.Y., Biryukova E.N., Medentsev A.G.* Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolitica* (Review) // Appl. Biochem. Microbiol. – 2015. – V.51. – P. 135–142.
10. *Belazzi T., Wagner A. et al.* Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element. // EMBO J.- 1991. – V. – 10. P. 585–92.
11. *Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.* Комплексный ответ дрожжей *Yarrowia lipolytica* на стрессовые воздействия. // История науки и техники. – 2020. -№ 11. – С. 52–59.

# Характеристика рекомбинантной метакрилатредуктазы RMrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1

*Архипова О.В.[1], Таухутдинова С.Р.[1], Ашин В.В.[1], Захарова М.В.[1], Микулинская Г.В.[2], Молочков Н.В.[3], Кутышенко В.П.[3], Прохоров Д.А.[3]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
[3] ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, aroksan@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37942

Сохранение окружающей природной среды в состоянии, приемлемом для жизни и здоровья всех составных компонентов живого, – одна из основных проблем современности. Решение этой задачи возможно и разумно с помощью использования биологических систем. Одним из таких экологически оправданных подходов может быть деградация отходов химических производств ферментами. Например, очистка стоков метакрилатных производств с помощью метакрилатной редокс системы. Метакрилат – соединение антропогенного происхождения, используется при производстве полимеров типа лаков и пластмасс, токсичен. Как метакрилатвосстанавливающая активность, так и опероны генов компонентов метарилатной редокс системы обнаружены у представителей ацетатокисляющих грамотрицательных анаэробных бактерий: *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1$^T$ (класс *Deltaproteobacteria*), *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809$^T$ (класс *Deferribacteres*) [1–3]. Восстановление метакрилата у *G. sulfurreducens* AM-1 осуществляется белками периплазмы. Метакрилатная редокс система состоит из двух белков [3]: 50 кДа метикрилатредуктазы (Mrd), содержащей нековалентно связанный ФАД; и 30 кДа мультигемового цитохрома *c* (Mcc). Mcc – физиологический донор Mrd. Периплазматическая редокс система «Mcc+Mrd» превращает метакрилат в изобутират – менее токсичное вещество. Метакрилат используется в качестве терминального акцептора электронов при анаэробном метакрилатном дыхании. Целью исследования было получение в чистом виде из клеток аэробно растущей *E. coli* рекомбинантного препарата метакрилатредуктазы (RMrd) анаэробной бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 и его характеристика.

Кодирующая последовательность *mrd* была клонирована в модифицированный плазмидный вектор pQE30, лишенный His-taq. Образование растворимого RMrd было достигнуто эспрессией гена в штамме *E.coli* M15, содержащем плазмиду pREP4, индуцированной ИПТГ, при температуре +20 °C. Белок RMrd был очищен из аэробно выращенных клеток *E. coli* до электрофоретической гомогенности (рис. 1). Очистка препарата RMrd после разрушения клеток ультразвуком была выполнена с применением фракционирования сульфатом аммония и адсорбционной хроматографии на гидроксиапатите. Было показано, что продукция RMrd в *E. coli* увеличивает выход препарата в 100 раз по сравнению с очисткой природного Mrd из клеток *G. sulfurreducens* AM-1. Кроме того, с помощью аналогичной схемы очист-

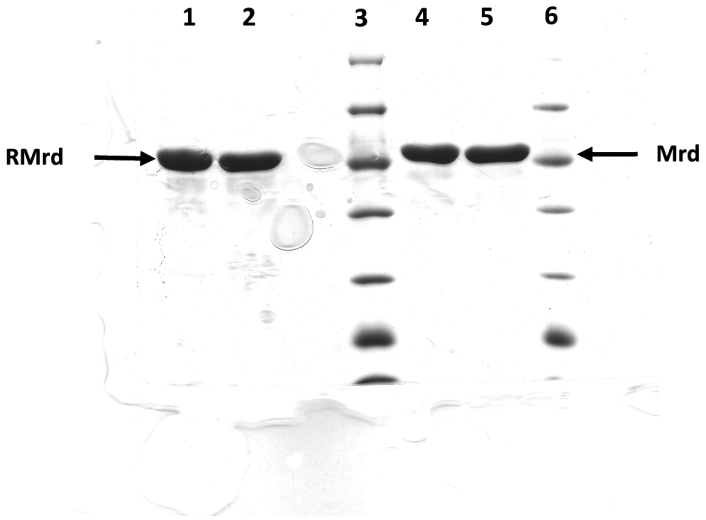



**Рис. 1.** Электрофореграмма очищенных препаратов Mrd и RMrd:
1,4 – 5 мкг RMrd; 2,5 –5 мкг Mrd; 3,6 – маркеры молекулярной массы: 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18 кДа и 14 кДа

ки был получен электрофоретически чистый препарат Mcc из клеток анаэроба *G. sulfurreducens* AM-1. RMrd обладал ферментативной активностью: как и природный Mrd, восстанавливал метакрилат в присутствии Mcc.

У рекомбинантного фермента были изучены молекулярные свойства. В частности, охарактеризована вторичная структура методом кругового дихроизма (КД), а также упаковка гидрофобного кора с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Изучены кинетические характеристики, а также исследована субстратная специфичность. Спектральные методы КД и ЯМР были впервые использованы для исследования структуры природного и рекомбинантного ферментов Mrd и RMrd. Были проанализированы сходство и различия свойств обоих препаратов. Препарат RMrd стабилен в присутствии ряда восстановителей дисульфидных связей и ингибиторов протеаз.

В ходе выполнения работы показана возможность получения в аэробных условиях рекомбинантного фермента анаэробной бактерии. Рекомбинантный фермент RMrd обладает активностью и представляет интерес для биотехнологии очистки окружающей среды от отходов метакрилатных производств.

## Литература

1. *Архипова О.В.* // История науки и техники. 2020. № 11. С. 60–64.
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. *Архипова О.В., Бирюкова Е.Н., Абашина Т.Н., Хохлова Г.В., Ашин В.В., Микулинская Г.В.* // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 144–153.
4. *Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R.K., Hedderich R.* // Eur.J. Biochem. 1999. V. 263. P. 346–352.

# Секвенирование и анализ генома бактерии *Marinobacterium* sp. OS 208 (КММ 9957), выделенной из донных осадков Охотского моря

*Балдаев С.Н., Отставных Н.Ю., Романенко Л.А., Исаева М.П.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, baldaevsergey@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37943

Изучение бактерий, изолированных из новых и малоизученных источников различных биотопов морской среды, является актуальной задачей. Микроорганизмы донных осадков представляют важный

компонент морских экосистем, вызывая особый интерес для научных исследований в области изучения микробного разнообразия, существования новых микроорганизмов и их биотехнологического потенциала (1).

Штамм бактерий OS 208 был выделен из образца донных осадков, отобранного в экспедиционном рейсе № 59 НИС «Академик Опарин» в сентябре 2020 г. в Охотском море, Россия, на глубине 21.8 метров. Выделенный штамм OS 208 был депонирован в Коллекцию морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН под номером КММ 9957. Штамм КММ 9957 представляет собой аэробные грамотрицательные галофильные подвижные палочковидные бактерии. Температурный интервал роста определен между 5 и 35 °С. Бактерии КММ 9957 растут при содержании в среде 0.5–6% NaCl, не гидролизуют желатин, крахмал, целлюлозу, не редуцируют нитраты в нитриты, гидролизуют тирозин и ДНК. Штамм КММ 9957 показал наибольший уровень сходства гена 16S рРНК (98.2%) с *Marinobacterium profundum* РАМС 27536$^T$. Для установления таксономического положения был получен черновой геном *Marinobacterium* sp. КММ 9957 с использованием NGS-технологии на платформе MiSeq (Illumina, США) при помощи набора реагентов Nextera DNA Flex kits (Illumina, USA). Сборка прочтений *de novo* осуществлена в контиги с помощью SPAdes 3.15.3, аннотация полученного чернового генома выполнена на сервере RAST. Геном *Marinobacterium* sp. КММ 9957 был собран в 861 контиг с N50 равным 124,865 п.н. Размер генома был оценен в 5,489,610 п.н. (полнота 99.48%, контаминация 4.91%), ГЦ-состав – 58.37%. Показатель ANI между *Marinobacterium* sp. КММ 9957 и типовыми штаммами *Marinobacterium aestuarii* ST58-10$^T$ и *M. profundum* РАМС 27536$^T$ составил 89.44% и 87.89% соответственно, что подтверждает принадлежность данного штамма к роду *Marinobacterium*. Филогенетическая позиция штамма была оценена на основе анализа конкатенированных последовательностей из 400 консервативных белков доступных представителей рода *Marinobacterium*. Полученные данные филогенетического анализа и физиолого-биохимических свойств показывают, что штамм бактерий КММ 9957 представляет, вероятно, новый вид рода *Marinobacterium*. Бактерии данного рода известны своей способностью к биодеградации бензол-содержащих соединений.

*Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).*

### Литература

1. *Lauro F.M., Bartlett D.H.* // Extremophiles 2008. 12. 5-25. DOI:10.1007/s00792-006-0059-5.

## Тест MPL Express SARS-CoV-2 FF для обнаружения РНК вирусов в пробе пациента

*Башкиров В.И., Гуторов М.А., Усвалиев А.Д.*

ООО «МАЙКРОБИО ПЛАНЕТАРИ ЛАБ», г. Москва,
mikhailgutorov@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37944

**Цель:** создать форпост, т.е. кооперацию организаций для оперативных разработки, сертификации и внедрения Теста на обнаружение РНК вирусов с заданными свойствами.

**1.** Послание Президента Федеральному Собранию 21 апреля 2021 года (http://kremlin.ru/events/president/news/65418 , стр. 11.): ...

Первое – **у нас должен быть мощный надёжный щит в сфере санитарной и биологической безопасности**…

Причём **сделать это надо с максимальным использованием российского оборудования и отечественных компонентов**. В случае появления инфекции, такой же опасной, как коронавирус, или, может быть, больше, не дай бог, **Россия должна быть готова в течение четырёх дней, именно в те-**

**чение четырёх дней, разработать собственные тест-системы** и в самое короткое время создать эффективную отечественную вакцину, **приступить к её массовому производству**. Эти задачи мы ставим перед собой. **Для достижения этих задач определяем период – к 2030 году. Но чем раньше мы это сделаем, тем лучше**».

**2.** Управление пандемией, вызванной SARS-CoV-2, требует новых возможностей тестирования, включая возможность в считанные минуты идентифицировать инфицированных людей, когда они входят в места, где они должны собираться, включая рабочие места, школы, пункты въезда и т.д. Здесь единственные полезные тесты те, которые:

(а) не требуют транспортировки образцов,

(б) требуют минимальных манипуляций с образцом,

(в) могут выполняться лицами, не имеющими лицензии,

(г) получать результаты на месте гораздо быстрее, чем за один час, и

(д) стоить не более нескольких сотен рублей (долларов).

Чувствительность не обязательно должна быть такой высокой, как обычно требуется для скрининга бессимптомных носителей (10 вирионов на образец (уровень хорошего ПЦР Теста), так как эта вирусная нагрузка недостаточно высока для того, чтобы человек представлял риск прямой инфекции. Это позволяет Тестам, особенно полезным для этой пандемии, найти компромисс между ненужной чувствительностью и необходимой скоростью, простотой и бережливостью. …

**Тест MPL Express SARS-CoV-2 FF, разработанный по методике DP-RT-LAMP** (Displaceable Probe – Reverse Transcription – Loop-mediated isothermal AMPlification), **соответствует заданным условиям.**

**3.** Тест для обнаружения РНК SARS-CoV-2 вируса в пробах пациента (по мазку и/или по слюне) отличается от аналогичных Тестов тем, что:

– возможно тестировать пациента по одной из двух проб: мазок или слюна, или по обоим пробам одновременно; в последнем случае достоверность результата тестирования ≥95%!

– не использует пробоподготовку пробы с использованием дорогих наборов для выделения и очистки РНК вируса; используется экспресс предподготовка (<15 минут) с использованием дешевого лизирующего раствора, который входит в состав Теста;

– имеет хорошую специфичность за счет использования двух групп Праймеров к различным участкам генома вируса;

– вместе с Тестом поставляется транспортная Тест-система для взятия мазка у пациента с оригинальным раствором, который не ингибирует ферменты тестирующей смеси;

– в одной пробирке мультиплицируются две ключевые реакции Теста: реакция тестирования пробы пациента и реакция Внутреннего Положительного Контроля (ВПК), – которая исключает ложно-отрицательный результат тестирования, показывая наличие или отсутствие в пробе пациента веществ, ингибирующих ферменты Теста.

Тест собран полностью на отечественных компонентах; с учетом расходов на производство, **себестоимость реагентов для тестирования одной пробы пациента** составляет ~ 135 рублей.

**Подтверждена работоспособность двух групп Праймеров Теста при взаимодействии с реальным РНК SARS-CoV-2 вирусом. Декабрь 2020 года.**

**4.** Создан задел, включая кооперацию с Партнерами, который позволяет рассчитывать на то, что **Тест на обнаружение РНК нового вируса в пробе пациента может быть разработан за четверо суток**:

1-е. Вычисление нуклеотидного состава для всех Праймеров, которые входят в состав Теста

2-е. Изготовление всех необходимых Праймеров (обычных, без меток).

3-и. Экспериментальная отладка состава смесей Теста (на основе ранее сертифицированного для другого вируса), калибровка устройства, реализующего электронный способ регистрации результатов тестирования проб пациентов*****.

4-е. То же, что и днем ранее + редакция документации на производство Теста.

**Утром пятого дня документация передается на производство.**

Реализации предложенного плана, безусловно, должно предшествовать как минимум три события:

1. Сертифицирован для медицинского применения Тест, разработанный на флуоресцентных метках.

2. Разработано, изготовлено и сертифицировано для медицинского применения устройство, реализующее электронный способ регистрации результатов тестирования проб пациентов*.

3. Геном нового вируса секвенирован и эта информация доступна Биоинформатикам.

* – Способ, в котором тестирование пробы осуществляется по той же методике RT-LAMP, но результаты реакций тестирования определяются не по флуоресцентному свечению, а по измерению электрических параметров раствора, в котором проводится тестирование.

## Функциональные гены бактерий, выделенных из акваторий Японского моря, ответственные за деструкцию ПАУ

*Богатыренко Е.А.[1], Ким А.В.[1,2], Медведева А.Д.[1], Дашков Д.В.[1], Дункай Т.И.[1,3]*

[1] ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, angelinka.medvedeva@list.ru
[2] ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток
[3] ННЦМБ им. А.В. Жирмунского, Владивосток

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37945

Высокая антропогенная нагрузка в прибрежных акваториях и районах активного судоходства Японского моря неизбежно приводит к загрязнению этих территорий различными поллютантами, включая нефть и нефтепродукты. Микроорганизмы, в силу своих физиолого-биохимических свойств, способны к деструкции углеводородов нефти, тем самым участвуют в самоочищении экосистем. В связи с этим, изучение механизмов, позволяющих микроорганизмам трансформировать нефть и нефтепродукты с помощью внутриклеточных ферментов, образование которых контролируется специфическими генами, является актуальной научной задачей.

Таким образом, **цель данной работы** – изучить таксономическое разнообразие углеводородокисляющих бактерий (УВОБ), выделенных из Японского моря, и выявить наличие у них функциональных генов, ответственных за деструкцию ПАУ.

### Материалы и методы

Материалом для работы послужили пробы поверхностных вод и верхнего окисленного слоя донных осадков Японского моря, полученные в 2018 и 2019 годах в ходе экспедиционных работ на НИС «Академик М.А. Лаврентьев», а также в ходе береговых экспедиций. Исследования проводились на 18 станциях в двух районах: в заливе Петра Великого и в западной части Японского моря. Согласно ГОСТ 31942-12 (2013) посев проб производили методом Дригальского на плотную модифицированную среду Ворошиловой-Дианової (1% нефть). Полученные чистые культуры бактерий использовали для всех последующих опытов.

Идентификацию бактерий проводили на основе анализа структуры их гена 16S рРНК (Lane et. al., 1985). Для осуществления ПЦР-амплификации использовали универсальные бактериальные праймеры, а также специфичные праймеры на функциональные гены: *Bph* (бифенил-2,3-диоксигеназа), *phn* (диоксигеназа, ответственная за деструкцию фенантрена), *ndo* (большая субъединица фермента нафталиндиоксигеназа), *nah* (нафталиндиоксигеназа) *narAa* и *narAb* (большая и малая субъединицы фермента цис-нафталин-1,2-диоксигеназы), *xylE* (катехол-2,3-диоксигеназа), *pdo* (диоксигеназа мета-пути) (Edlund, Jansson, 2008; Park, Crowely, 2006; Ferrero et al., 2002; Laurine, Lloyd-Jones, 1999; Andreoni, et. al., 2008). Все ПЦР-продукты визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле.

### Результаты

В ходе работы было выделено и идентифицировано 22 штамма бактерий, выделенных из акваторий Японского моря. Представители обнаруженных родов *Achromobacter, Acinetobacter, Alcanivorax,*

*Citrobacter, Halomonas, Paenibacillus, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Rhodococcus, Serratia, Thalassospira*, согласно литературным данным, довольно часто встречаются в морской среде и способны к деструкции углеводородов (Уварова и др., 2014; Buzoleva et al., 2017; Wang et. al., 2014; Miettinen et. al., 2019).

Было выявлено, что у большинства выделенных из акваторий Японского моря штаммов бактерий чаще всего встречались ген *xylE,* ответственный за синтез фермента катехол-2,3-диоксигеназы (обнаружен в 18 выделенных штаммах). Следующим по встречаемости геном, ответственным за окисление ПАУ, оказался ген *nah*, кодирующий синтез фермента нафталиндиоксигеназы (обнаружен у 10 изолятов). Ген, ответственный за синтез большой субъединицы фермента нафталиндиоксигеназы *ndo*, обнаружен в 7 изолятах. Ген *phn*, ответственный за синтез диоксигеназы, катализирующей деградацию фенантрена, обнаружен в 6 изолятах. Гены *narAa* и *narAb* кодирующие, большую и малую субъединицы фермента цис-нафталин-1,2-диоксигеназы, которая опосредует деградацию нафталина, были обнаружены в пяти и двух изолятах, соответственно. Меньше всего представлен ген *pdo,* ответственный за расщепление ароматического кольца ПАУ по мета-пути: обнаружен только в двух изолятах, оба из которых являются представителями рода *Pseudomonas*. Ген *Bph,* который по литературным данным ответственен за разложение бифенила, среди выделенных изолятов не был обнаружен.

Полученные данные свидетельствуют о том, что бактерии, благодаря широкому метаболическому потенциалу, способны к деструкции разнообразных углеводородов нефти. Помимо этого, у представителей одного или разных родов бактерий трансформация одних и тех же нефтяных углеводородов может осуществляться различными метаболическими путями.

## Литература


1. *Lane D.J.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses / D.J. Lane, B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin, N.R. Pace // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – Vol. 82, № 20. – P. 6955–6959.
2. *Miettinen H.* Oil degradation potential of microbial communities in water and sediment of Baltic Sea coastal area / H. Miettinen, M. Bomberg, M. Nyyssönen, A. Reunamo, K.S. Jørgensen, M. Vikman // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, № 7. – e0218834.
3. *Wang W.* Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea / W. Wang, R. Zhang, D. Shan, Z. Shao // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98, № 16. – P. 7253–7269.
4. *Buzoleva L.S.* Oil-oxidizing activity of bacteria isolated from south Sakhalin coastal waters / L.S. Buzoleva, E.A. Bogatyrenko, M.A. Repina, N.L. Belkova // Microbiology. – 2017. – Vol. 86, № 3. – P. 338–345.
5. *Уварова Н.М.* Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводородов микроорганизмами / Н.М. Уварова, Е.А. Слынько, А.С. Демидов, С.Е. Розанов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 4/2. – С. 999–1012.
6. *Edlund A.* Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify psychrotolerant phenanthrene-degrading bacteria in phenanthrene-enriched polluted Baltic Sea sediments / A. Edlund, J.K. Jansson // FEMS Microbiology Ecology. – 2008. – Vol. 65, № 3. – P. 513–525.
7. *Park J.W.* Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils / J.W. Park, D.E. Crowley // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P.1322–1329.
8. *Ferrero M.* Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // M. Ferrero, E. Llobet-Brossa, J. Lalucat, E. García-Valdés, R. Rosselló-Mora, R. Bosch // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Vol. 68, № 2. – P. 957–962.
9. *Laurie A.D.* The *phn* genes of *Burkholderia sp*. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism / A.D. Laurie, G. Lloyd-Jones // Journal of Bacteriology. – 1999. – Vol. 181, № 2. – P. 531–540.
10. *Andreoni V.* Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN / V. Andreoni, S. Bernasconi, M. Colombo, J.B. Van Beilen, L. Cavalca // Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 2, № 5. – P. 572–577.

# Выявление генов, характерных для бактерий, обладающих стероидным катаболизмом

*Брагин Е.Ю., Довбня Д.В., Донова М.В.*

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37946

Изучение молекулярных механизмов стероидного катаболизма бактерий представляет значительный практический и теоретический интерес, в связи с высоким биотехнологическим потенциалом для применения в фармацевтике, биомедицине, ветеринарии, агрохимии и защите окружающей среды от соединений, вызывающих эндокринные нарушения.

В настоящее время одним из основных методов поиска генов стероидного катаболизма является полнотранскриптомный анализ, позволяющий выявить гены, дифференциально экспрессирующиеся в различных условиях индукции стероидными соединениями (ДЭГ). Однако, эффективность данного подхода осложняется значительным числом выявляемых ДЭГ. Например, у штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 было выявлено 572 гена, экспрессия которых увеличивалась в присутствии холестерина (Uhia et al., 2012), при этом число генов, непосредственно вовлеченных в катаболизм холестерина, – существенно ниже. Целью настоящей работы являлась разработка биоинформатического подхода для выявления генов, потенциально вовлеченных в катаболизм стероидов в геномах бактерий, доступных в публичных базах данных.

Поиск генов осуществляли с помощью программы BLAST+ (Altschul *et al*., 1990). Для автоматизации данного процесса и обработки полученных результатов нами были разработаны программы на языке программирования Perl. Первая программа автоматически генерирует список команд, запускающих другие программы, в том числе и BLAST+ из терминала операционной системы Linux. Остальные программы извлекали из текстовых файлов в которых была записана информация о результатах работы BLAST+ данные о количестве идентичных аминокислот и некоторые другие данные и объединяли их в файл формата csv.

Ранее мы секвенировали транскриптомы культур штамма *Mycolicibacterium fortuitum ВКМ Ac-1817Д, выращенных в присутствии холестерина, ситостерина, а также на среде, не содержащей стероидных соединений. Экспрессия 212 генов увеличивалась в присутствии обоих стеринов (Bragin et al., 2019).*

*В данной работе анализировали более, чем 500 бактериальных геномов, на наличие ключевых генов деградации стероидов* – 3-кетостероид-$\Delta^1$-дегидрогеназы (*kstD*), а также оксигеназной и редуктазной субъединиц 3-кетостероид-9α-гидроксилазы (*kshA* и *kshB* соответственно). Штаммы, у которых не было обнаружено ни одного гена, чей продукт был бы идентичен с KstD, KshA или KshB *M. tuberculosis* более, чем на 30% считались не обладающими стероидным катаболизмом. Таких штаммов было выявлено 371, и их геномы были объединены в группу 1. Штаммы, у которых были обнаружены гены, чьи продукты были схожи с референсными белками KstD, KshA и KshB не менее чем на 40%, считались обладающими стероидным катаболизмом. Такие штаммы, а также штаммы, у которых было постулировано наличие стероидного катаболизма в работе Bergstrand et al., 2016, были объединены в группу бактерий, обладающих стероидным катаболизмом, (Группа 2). Общее количество штаммов в данной группе составило 83, при чем 62 штамма относились к актинобактериям, а 21 – к протеобактериям. Далее производили выравнивание продуктов каждого из 212 стерин-индуцируемых генов с каждым из отобранных геномов и считали среднюю идентичность ($И_{ср}$) для каждого гена и каждой группы геномов. $И_{ср}$ была равна сумме обнаруженных программой BLAST+ идентичных аминокислот между геном и всеми геномами группы, деленной на длину гена, умноженную на количество геномов в группе.

Для 164 генов было показано, что $И_{ср}$ этих генов с группой геномов бактерий № 1 не менее чем в два раза меньше, чем с группой геномов № 2, а для 69 генов – не менее чем в 5 раз.

Поскольку штамм *M. fortuitum ВКМ Ac-1817Д относится* к актинобактериям, и большинство бактерий обладающих стероидным катаболизмом – тоже, некоторые гены, чья $И_{ср}$ с геномами бактерий, обладающих стероидным катаболизмом выше, чем с не обладающими таковым могут быть специфичны для актинобактерий, а не для бактерий со стероидным катаболизмом. Поэтому геномы протеобактерий, обладающих стероидным катаболизмом были выделены в группу 3.

Далее мы провели поиск генов, для которых $И_{ср}$ с группой геномов № 3 не менее чем в 2 раза выше, чем с группой № 1. Таких генов было обнаружено 43. У 29 генов $И_{ср}$ с геномами группы № 1 более чем в 5 раз меньше, чем с группой № 2, и не менее, чем в раза меньше чем группой № 3. Таким образом, эти гены специфичны для бактерий, обладающих стероидным катаболизмом, а также увеличивают свою экспрессию в присутствии стеринов. Это указывает на то, что эти гены связаны со стероидным катаболизмом.

Таким образом, разработанный алгоритм позволяет проводить поиск потенциальных стероидтрансформирующих штаммов, а также провести выявление генов, характерных для бактерий, обладающих стероидным катаболизмом.

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант 21-64-0024).*

## Литература

1. *Uhía I., Galán B., Kendall S.L., Stoker N.G., García J.L.* Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: Cholesterol pathway // Environmental Microbiology Reports, 2012, Vol. 4, No. 2, P. 168–182.
2. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology, 1990, Vol. 215, No. 3, P. 403–410.
3. *Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Donova M.V.* Genome-wide response on phytosterol in 9-hydroxyandrostenedione-producing strain of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D//BMC biotechnology, 2019, Vol. 19, No. 1, P. 39.
4. *Bergstrand L.H., Cardenas E., Holert J., Van Hamme J.D., Mohn W.W.* Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis//mBio, 2016, Vol. 7, No. 2.

# Секвенирование и анализ генома альфапротеобактерии КММ 6723, выделенной из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*

*Быстрицкая Е.П., Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Исаева М.П.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, belyjane@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37947

Целью данного исследования являлось изучение геномных и фенотипических свойств нового штамма КММ 6723, выделенного из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, собранной в Охотском море у побережья о. Парамушир (Курильские о-ва). Результаты филогенетического анализа, основанного на секвенировании 16S рРНК гена, показали, что новый изолят относится к сем. *Rhodobacteraceae* класса *Alphaproteobacteria* филума *Proteobacteria* и образует кластер с типовыми штаммами *Aquicoccus porphyridii* L1 8-17$^T$, *Marimonas arenosa* CAU 1311$^T$ и видов рода *Tropicibacter.* Ближайшим филогенетическим соседом штамма КММ 6723 является '*Tropicibacter alexandrii*' LMIT 003$^T$ с 97.1% сходства последовательностей.

Клетки штамма КММ 6723 грамотрицательные, неподвижные и палочковидные. На морском агаре они образуют бежевые колонии и растут при 4–40 °C и в присутствии 0–5% хлорида натрия. Бактерия гидролизует крахмал, эскулин и твины 20, 40 и 80, но агар, казеин, желатин, хитин и ДНК не деградирует. Штамм КММ 6723 продуцирует нитратредуктазу, цитохром оксидазу, щелочную и кислую фосфатазы, эстеразу (C4), эстеразу липазу (C8), лейцин- и валин-ариламидазы, и нафтол-AS-BI-фосфогидролазу. Присутствие таких ферментов как липаза (C14), цистин-ариламидаза, трипсин, a-химотрипсин,

а- и в-галактозидазы, в-глюкуронидазу, а- и в-глюкозидазы, N-ацетил-глюкозаминидаза, а-маннозидаза и а-фукозидаза не выявлено.

Геном морской бактерии КММ 6723 был секвенирован с помощью технологии Illumina на базе платформы MiSeq (Illumina, США) и набора реагентов Nextera DNA Flex kits (Illumina, USA). Прочтения были отфильтрованы по качеству и собраны *de novo* в контиги с помощью SPAdes 3.15.3, аннотация генома была проведена на сервере RAST. Геном КММ 6723 был собран в 73 контига с N50 равным 702161 п.н., размер генома был оценен в 3754741 п.н. (полнота 98.24%, контаминация 0.04%.), ГЦ-состав – 62.14%.

На филогеномном дереве штамм КММ 6723 формирует отдельную ветвь, ближайшую к кладам *Marimonas lutisalis* GH1 19$^{T}$ и *Aquicoccus porphyridii* L18 17$^{T}$, но не к бактериям рода *Tropicibacter*. Полученные данные позволяют предположить, что штамм КММ 6723 является представителем нового рода, однако для подтверждения этой гипотезы требуется проведение дополнительных исследований.

*Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).*

## Конфликт концепции типового образца в систематике грибов в геномную эру и способы его преодоления

*Василенко О.В., Тепеева А.Н., Арзамасцева В.О.*

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37948

В настоящее время главным методом корректного и объективного познания системы живого мира становится геномика, основанная на тотальном секвенировании нуклеиновых кислот. В дополнение к Международному кодексу номенклатуры прокариот [1] признаны критерии использования геномных данных в таксономии прокариот [2]. Эти критерии вводят формализованные объективные стандарты дискриминации видов на основании средней нуклеотидной идентичности (average nucleotide identity, ANI). Такой прорыв является зародышем общей тенденции в изучении биоразнообразия всего живого мира. Не случайно представители Национальных институтов здоровья США и кураторы ГенБанка откликнулись на введение этих критериев не только описанием нового порядка депонирования геномных последовательностей прокариот, но и анонсом применения этих принципов к геномным данным всех эукариот, начиная с грибов [3].

Упомянутые позитивные инновации предполагают возможность и необходимость получения и депонирования в публичных базах геномных последовательностей типовых образцов как основы построения современной систематики. Проблема состоит в том, что не для всех признанных категорий типовых образцов это принципиально возможно. Международный кодекс номенклатуры прокариот вполне готов к таким нововведениям, поскольку в качестве типового образца за редчайшими исключениями назначаются соответствующие штаммы, размещённые в двух независимых уполномоченных коллекциях [1]. Международный кодекс номенклатуры водорослей, грибов и растений (https://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php) в качестве типового образца признаёт гербарный образец, изображение или культуру, сохранённую в метаболически неактивном состоянии. Абсолютное большинство типовых образцов грибов существует в виде мертвых гербарных образцов или изображений, которые непригодны или ограниченно пригодны для секвенирования: бесполезность изображений в целях геномики очевидна, а использование гербарных образцов затруднено из-за низкого качества ДНК, загрязнённости чужеродной ДНК, а также невозможности полноценной аннотации генома неживого образца методами транскриптомики. Таким образом микология рискует оказаться на обочине общей тенденции: взрывного развития отрасли знаний, катализируемого геномикой.

Исходя из понимания этих проблем, мы видим следующие принципиальные задачи для микологии:

1) ввести хотя бы гербарный эпитип для таксонов, типом которых являются изображения;

2) провести в глобальном масштабе секвенирование всех микологических типовых гербарных образцов для документирования драфт-геномов;

3) по данным секвенирования подобрать к типовым гербарным образцам наиболее близкие в терминах ANI живые культуры;

4) в исследованиях, которые могут привести к описанию новых видов, с самого начала проводить сбор гербарных образцов с одновременным выделением живых культур, которые при описании нового вида в случае микромицетов станут типовыми культурами, а в случае макромицетов – ex-type штаммами при утверждённом типовом гербарном образце.

Эти принципы мы системно применяем при филогеномном изучении класса Пезизовых (Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka) в рамках ещё более широкой задачи – построения филогеномного дерева жизни царства грибов (Fungi).

Мы имеем потенциальный доступ к значительному количеству гербарных образцов этого класса (порядка 500 в коллекции БИН РАН) и 8 живых штаммов из нашей коллекции ВКМ. Это соотношение вполне адекватно отображает описанную выше проблему. В качестве мер первого порядка мы получаем молекулярную характеристику имеющихся культур методом секвенирования длинного баркода [4], что позволит нам точно таксономически определить и охарактеризовать коллекционные штаммы и использовать их для построения филогенетического дерева. В качестве дополнительного источника данных мы выделяем культуры из собранных в природе плодовых тел, одновременно создавая из них гербарные образцы, и таким образом к настоящему моменту имеем две пары гербарный образец – культура, которые в ближайшее время будут охарактеризованы секвенированием длинных баркодов.

## Литература


1. *Charles T. Parker, Brian J. Tindall and George M. Garrity.* International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2008 Revision) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. Vol. 69 (1A): S1–S111. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778
2. *Chun et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data forthe taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68: 461–466 https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516
3. *Ciufo et al.* Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68: 2386–2392. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809
4. *Vasilenko O., Ivanushkina N., Starodumova I., Kochkina G., Danilogorskaya A., Pinchuk I., Telkov M., Ozerskaya S.* The advantage of the usage of the long "boosted" fungal barcode that uncludes its 1/2 region and D1/D3 domain of the 26S large subunit ribosomal DNA // XXXVII annual meeting of the European culture collections' organisation conference proceedings. 13–14 September 2018, Moscow, Russia. – M.: MAKS Press, – 2018. – P. 126–127.


# Регуляция первичного некроза в дрожжах *S. cerevisiae* внеклеточным pH и экзогенным $K^+$


*Валиахметов А.Я.*

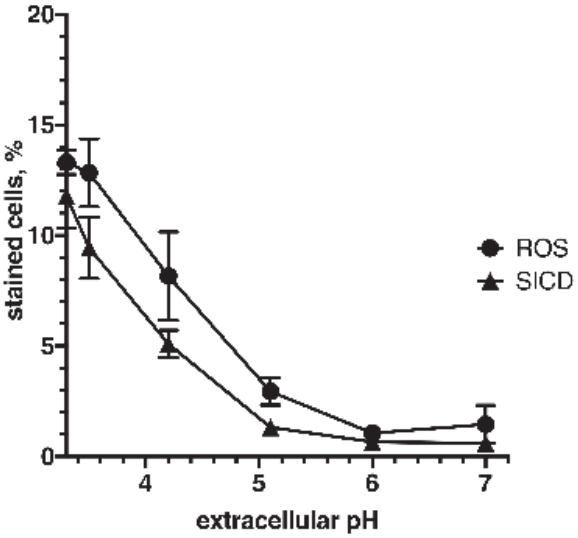
ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
airatv@ibpm.pushchino.ru

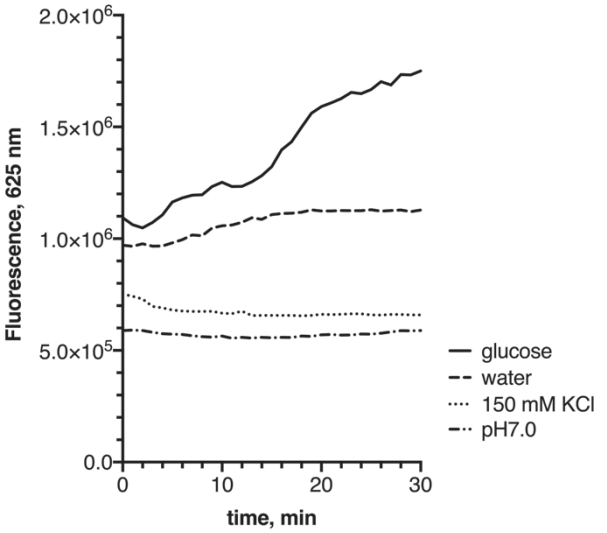


DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37949


Целью исследования являлось выявление клеточных механизмов, лежащих в основе первичного некроза у дрожжей. В связи с нарастающей проблемой микозных инфекций, вопрос индукции некроза внутри- и внеклеточными факторами приобретает особое значение. На данный момент, причиной пер-

вичного некроза считается влияние внешних физических и химических факторов (экстремальные температура, pH, осмотическое давление, токсичные вещества и т.д.). Нами показано, что первичный некроз может наступать и при отсутствии токсических воздействий. В частности, инкубация клеток *S. cerevisiae* с глюкозой, в отсутствии других питательных веществ, приводит к быстрому развитию первичного некроза у части клеточной популяции. Основным методом исследования был анализ динамики развития первичного некроза методом проточной цитометрии. Ранее нами было показано, что глюкоза-индуцированный некроз (SICD) происходит в популяции клеток, находящихся в S фазе клеточного цикла. SICD оказался быстрым процессом нечувствительным к циклогексимиду, сопровождался ростом концентрации ROS и разрушением внутриклеточных структур. Обработка клеток такими скавенджерами ROS как аскорбат, глутатион и N-ацетил-цистеин приводит к подавлению SICD, что указывает на первичную роль ROS в развитии некроза. Однако, для проявления своих антиоксидантных свойств, аскорбат должен быть в нейтрализованной форме. Аскорбат (слабая кислота) нейтрализованный NaOH (сильное основание) представляет собой буфер с pH 7.0. Толчком для настоящего исследования послужил не принимаемый во внимание факт двойственной природы нейтрализованного аскорбата – скавенджер ROS с одной стороны, и буфер с pH 7.0 с другой. Проверка показала прямую зависимость генерации ROS и развития SICD от внеклеточного pH. По мере повышения внеклеточного pH уменьшалось количество клеток с ROS и SICD. Поскольку влияние внеклеточного pH на функционирование дрожжевой клетки имеет комплексную природу, мы проверили вовлеченность некоторых сигнальных путей и отдельных генов на подавление SICD нейтральным pH. Мутационный анализ показал, что *Rim101/PacC* (сенсор внеклеточного pH) и *PKA* (регулятор метаболизма сахаров) сигнальные системы не вовлечены в развитие SICD (штаммы *Δrim21*, *Δira2*). Также в этот процесс не вовлечена метакаспаза дрожжей (штамм *Δyca1*), ингибирование которой при кислом pH приводит к смене типа клеточной смерти с апоптоза на некроз. Основные источники ROS – митохондрии и NADPH оксидаза ЭПР (*Δafo1* и *Δyno1*) также не участвуют в процесс развития некроза и его подавления нейтральным pH. Более того, двойной мутант *Δyno1/rho*$^0$ также показал чувствительность SICD к нейтральному pH. Делеция генов, регулирующих динамику актина (которая опосредованно, через митохондриальный мембранный потенциал, регулирует уровень ROS в клетке) -Δ*end3*, Δ*scp1* и Δ*sla1*- также не влияла на подавление некроза внешним pH. Поскольку чувствительность SICD к нейтральному pH не обусловлена функционированием ни одной из проверенных клеточных систем, мы предположили, что возможно $\Delta\mu H^+$ вовлечён в этот эффект. Клетки *S.cerevisiae* при инкубации с глюкозой в течение 5 минут закисляют среду до pH 3,5. Это создаёт большой ΔpH на плазматической мембране, которого нет при инкубации клеток при pH 7. Разрушение такого высокого ΔpH протонофором DNP (0,5 мМ) привело к 80% подавлению SICD и генерации ROS. Роль второго компонента мембранного потенциала – ΔΨ – была проверена в опытах с экзогенным KCl. Экзогенный $K^+$ в концентрации 150 мМ подавлял SICD на 80%. Для того, чтобы выяснить какая из 2 компонент $\Delta\mu H^+$ (ΔpH или ΔΨ) ответственна за подавление SICD высоким внешним pH, мы отследили качественное изменение мембранного потенциала с помощью флуоресцентного красителя DiOC2(3). Чтобы отследить изменения мембранного потенциала



только на плазматической мембране и исключить вклад митохондриального мембранного потенциала мы использовали *rho*$^{0}$ (петит) штамм.

Как видно инкубация клеток в водном растворе глюкозы, приводит к значительному росту ΔΨ. Инкубация клеток с глюкозой в буфере с pH7 или в присутствии 150 мМ KCl полностью подавляет этот рост ΔΨ. Важно отметить, что закисление среды в присутствии 150 mM KCl даже немного превышало закисление при инкубации только с глюкозой вследствие $K^+/H^+$ антипорта. Т.е. значительный ΔpH присутствовал на плазматической мембране. Однако, как отмечено выше, при этом мы наблюдали 80% ингибирование генерации ROS и развития SICD. Таким образом, мы можем предположить, что ΔΨ, скорее, чем ΔpH, ответственна за генерацию ROS и последующее развитие SICD.

Суммируя полученные данные, мы можем констатировать, что первичный некроз (SICD) подавляется 1) при разрушении ΔpH нейтральным pH или обработкой DNP и 2) при диссипации ΔΨ в присутствии 150 mM внеклеточного KCl. Данные факты позволяют нам предполагать, что $\Delta\mu H^+$ на плазматической мембране регулирует развитие SICD в дрожжах *S.cerevisiae*. Природа $\Delta\mu H^+$ – зависимого генератора ROS пока остаётся невыясненной

## Замена K320N в хеликазном домене Cas3 влияет на выбор спейсеров в ходе праймированной адаптации и на эффективность интерференции в системе CRISPR-Cas I-E *Escherichia coli*

*Ваулин Н.С.[1*], Ширяева А.А.[2,3], Северинов К.В.[2,4,5]*

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург
[2] Сколковский институт науки и технологий, Москва
[3] Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург
[4] Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва
[5] Институт микробиологии Ваксмана, Ратгерский университет, Нью-Джерси, *vaulin@ro.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37950

CRISPR-Cas – это прокариотические системы приобретенного иммунитета [1]. Они состоят из генов *cas* и CRISPR-кассет, включающих в себя короткие повторы, разделенные уникальными последовательностями – спейсерами. Мишенью систем CRISPR-Cas являются последовательности нуклеиновых кислот, идентичные или близкие спейсерам, но находящиеся вне CRISPR-кассеты (протоспейсеры). Функционирование систем CRISPR-Cas можно разделить на три этапа: адаптацию, экспрессию и интерференцию.

В ходе адаптации происходит встраивание в кассету коротких фрагментов ДНК (преспейсеров) в качестве новых спейсеров. В системе CRISPR-Cas I-E *E. coli* адаптация осуществляется белками Cas1 и Cas2 [2]. На последующем этапе экспрессии CRISPR-кассета транскрибируется с образованием коротких молекул крРНК, содержащих по одному спейсеру [3]. Молекулы крРНК связываются белками Cas, образуя эффекторный комплекс, который способен распознавать протоспейсеры, запуская процесс интерференции.

Связывание крРНК с комплементарной ей цепью таргетируемого протоспейсера приводит к образованию R-петли и привлечению АТФ-зависимой SF2 хеликазы Cas3, содержащей нуклеазный HD-домен [4, 5]. *In vitro* Cas3 вносит однонитевой разрыв в некомплементарную крРНК цепь протоспейсера, связывается с образовавшимся 3’-концом, расплетает ДНК в направлении 3’→5’ и разрезает обе цепи по ходу движения [6]. Это приводит к процессивной деградации ДНК-мишени слева от протоспейсера (рис. 1А).

Выделяют два типа адаптации. В ходе наивной адаптации спейсеры приобретаются из какого-либо участка ДНК впервые. В ходе праймированной адаптации на таргетируемом протоспейсере собирается комплекс PAC (primed acquisition complex), состоящий из белков Cas1, Cas2, Cas3 и эффекторного ком-

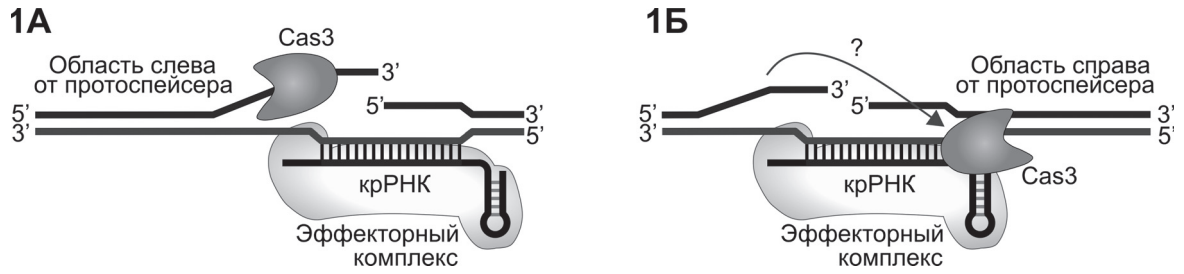



**Рис. 1.** Движение Cas3 по ДНК в направлении 3'→5' слева (1А) или справа (1Б) от протоспейсера

плекса Cascade [7]. Благодаря хеликазной активности Cas3, PAC движется по ДНК, захватывая преспейсеры из участков, фланкирующих таргетируемый протоспейсер.

В отличие от экспериментов *in vitro*, *in vivo* выбор новых спейсеров и деградация ДНК происходят как слева, так и справа от таргетируемого протоспейсера (Рис. 1Б) [8]. Механизм смены направления движения Cas3 остаётся неизвестным.

В данной работе мы проанализировали влияние аминокислотной замены K320N в АТФ-связывающем мотиве Walker A хеликазного домена Cas3 на интерференцию и праймированную адаптацию. В качестве модели мы использовали штамм *E. coli*, содержащий гены *cas* под контролем индуцибельных промоторов и единственный спейсер, таргетирующий собственный геном клетки. В отличие от широко используемых плазмидных моделей, в нашей модели размер генома в несколько десятков раз превышает размер участка, подверженного интерференции. Благодаря этому, удаётся проанализировать эффективность адаптации слева и справа от таргетируемого протоспейсера без перекрытия этих областей, а также определить границы подверженного интерференции участка и эффективность данного процесса.

Высокопроизводительное секвенирование CRISPR-кассет из клеток, содержащих $Cas3^{wt}$ или $Cas3^{K320N}$, показало, что замена K320N ингибирует приобретение спейсеров справа от таргетируемого протоспейсера (падение эффективности в ~200 раз). При этом наблюдается лишь ~2-кратное снижение эффективности выбора спейсеров слева от него.

Полногеномное секвенирование ДНК, выделенной из клеток дикого типа, продемонстрировало снижение покрытия в непосредственной близости от таргетируемого протоспейсера в ~50 раз по сравнению с фланкирующими участками, не затронутыми интерференцией. В клетках, содержащих $Cas3^{K320N}$, было выявлено лишь ~1,5-кратное снижение. При этом в обоих случаях деградация ДНК наблюдается, как слева, так и справа от таргетируемого протоспейсера. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что область, подверженная деградации, уменьшается при инактивации нуклеазы RecBCD в клетках с $Cas3^{wt}$. В рамках настоящей работы мы получили мутантный штамм Δ*recB*, экспрессирующий $Cas3^{K320N}$. Анализ покрытия ДНК в полученном штамме не выявил снижения содержания ДНК в районе таргетируемого протоспейсера по сравнению с фланкирующими областями.

Полученные данные свидетельствуют о значительном снижении нуклеазной активности $Cas3^{K320N}$ по сравнению с $Cas^{wt}$. При этом данная замена ингибирует приобретение спейсеров справа от таргетируемого протоспейсера, но почти не влияет на выбор спейсеров слева от него. Мы предлагаем модель, согласно которой после разрезания цепи протоспейсера, некомплементарной крРНК (верхняя цепь на Рис.1), $Cas3^{wt}$ вносит разрыв в комплементарную цепь (нижняя цепь на Рис.1), что позволяет ему связаться с образовавшимся свободным 3'-концом и начать движение в направлении 3'-5' справа от таргетируемого протоспейсера. На фоне сниженной нуклеазной активности $Cas3^{K320N}$ не происходит расщепления нижней цепи, поэтому $Cas3^{K320N}$ движется только по верхней цепи слева от протоспейсера, где наблюдается эффективный выбор новых спейсеров.

*Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект №19-14-00323).*

## Литература

1. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / Barrangou R. et al. // Science. 2018. V. 315. P. 1709–1712.
2. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity / Nuñez J.K. et al. // Nature. 2015. V. 519. P. 193–198.

3. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes / Brouns S.J. et al. // Science. 2008. V. 321. P. 960–964.
4. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade / Jore M.M. et al. // Nature Structural and Molecular Biology. 2011. V. 18. P. 529–536.
5. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3 / Westra E.R. et al. // Molecular Cell. 2012. V. 46. N. 5 P. 595–605.
6. *Mulepati S., Bailey S.* In vitro reconstitution of an Escherichia coli RNA-guided immune system reveals unidirectional, ATP-dependent degradation of DNA target // Journal of Biological Chemistry. 2013. V. 288. N. 31. P. 22184–22192.
7. Assembly and Translocation of a CRISPR-Cas Primed Acquisition Complex / Dillard K.E. et al. // Cell. 2018. V. 175. N. 4. P. 934–946.
8. Detection of spacer precursors formed in vivo during primed CRISPR adaptation / Shiriaeva A.A. et al. // Nature Communications. 2019. V. 10. P. 4603.

## Искусственно синтезированные гены фитохелатинов для эффективного связывания тяжелых металлов растениями

*Вершинина З.Р., Таминдарова Д.А., Саитгареева А.Л., Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Масленникова Д.Р.*

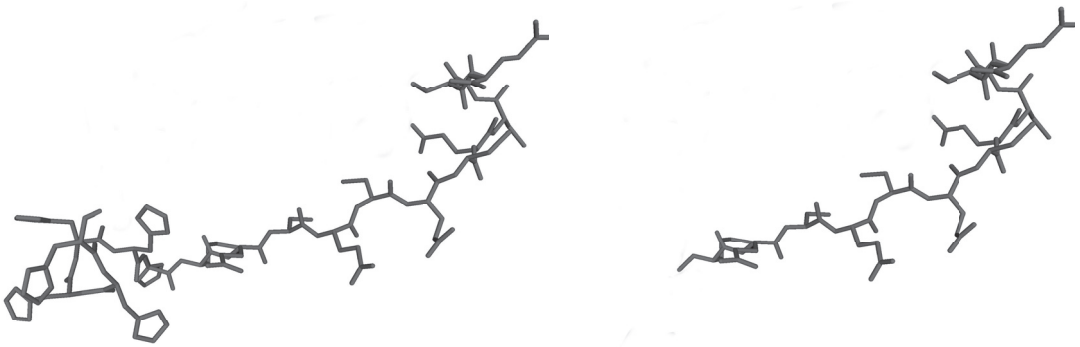
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», zilyaver@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37951

В настоящее время все более актуальной становится проблема загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), которые токсичны для всех живых организмов и вызывают заболевания животных и человека. Одним из наиболее безопасных методов биоремедиации почв является фиторемедиация. Главная задача в фиторемедиации – это выбор оптимальных растений-гипераккумуляторов, которые способны накапливать большие концентрации ТМ. Для повышения фиторемедиационной эффективности подобных растений целесообразно использовать ростостимулирующие микросимбионты, трансформированные генами, кодирующими синтез металлсвязывающих пептидов. В результате подобные микроорганизмы либо смогут защитить растения от стрессового воздействия за счет связывания ТМ, либо наоборот, будут способствовать накоплению ТМ в используемых растениях, например, в случае бактерий-эндофитов [1].

Ранее были получены генно-инженерные конструкции для трансформации разных родов бактерий искусственно синтезированным геном *pph6,* собранным из комплементарных блоков 5'ATGGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGCGAATGTGGCTAA3' и 5'TTAGCCACATTCGCACTCGCACTCGCACTCACATTCGCATTCCAT3', и было выявлено, что продукт гена *pph6* повышает устойчивость микроорганизмов к ТМ [2]. Новый ген *pph6his* был собран из блоков 5'ATGCACCACCACCACCACCACGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGCGAATGT-GGCTAA3' и 5'TTAGCCACATTCGCACTCGCACTCGCACTCACATTCGCATTCGTG-GTGGTGGTGGTGGTGCAT3' с 6His-tag на N-конце (рис. 1). Метка 6-His была добавлена в последовательность для обнаружения целевого пептида в бактериальных белках. После сшивки данных блоков, последовательность была клонирована в вектор для трансформации бактерий pJN105 под управлением промотора T5. Дальнейшие исследования будут посвящены изучению физиологических параметров полученных бактерий при росте на тяжелых металлах и перспективам использования гена *pph6his* в биоремедиации.

*Работа была выполнена в рамках Программы создания и функционирования карбонового полигона на территории Республики Башкортостан «Евразийский карбоновый полигон» на 2021–2022 годы.*



А Б

**Рис. 1.** Структура pph6his (А), pph6(Б)

## Литература


1. *Хакимова Л.Р., Благова Д.К., Лавина А.М., Сербаева Э.Р., Садыкова Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х.* (2018). Создание микробно-растительных сообществ для фиторемедиации // Доклады Башкирского университета. 2018. Т. 3(4). С. 473–476.
2. *Хакимова Л.Р., Каримова Л.Р., Вершинина З.Р.* Получение рекомбинантных *Rhizobium leguminosarum*, устойчивых к тяжелым металлам // Биомика. 2020. Т. 12(1). С. 50–56. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-4


# Исследование ранней фазы ответа на голодание по источнику углерода и энергии у растущих культур *Bacillus subtilis*


*Габова А.О.[1], Чурин Г.Ю.[2], Тюленев А.В.[3]*

[1] Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, ms.anya.05@mail.ru
[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь
[3] «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37952


Фаза раннего ответа бактерий на стрессы характеризуется быстрым изменением физиологических параметров культуры. Такие быстрые изменения трудно выявить, применяя традиционные физиолого-биохимические методы, предусматривающие отбор проб с последующим их анализом. Одним из способов решения проблемы может быть сочетание традиционных методов с синхронной регистрацией важных физиологических параметров с помощью электрохимических сенсоров. Использование сенсоров позволяет производить измерения таких параметров как дыхательная активность, редокс-потенциал (ОВП, Eh) и трансмембранные потоки ионов в режиме реального времени непосредственно в растущей бактериальной культуре. Такой подход был применен ранее для изучения ответа грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* на стрессы (Smirnova et al., Amino Acids, 2019,51,1577-1592. DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2). В настоящей работе электрохимические сенсоры были применены для исследования быстрого ответа растущих культур грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* на стресс, индуцируемый голоданием по источнику углерода и энергии.

В работе использовался штамм *Bacillus subtilis*-428 из коллекции ВКМ. Бактерии выращивали на среде М9 с добавлением микроэлементов в термостатируемом орбитальном шейкере при 37 °С. В качестве источника углерода и энергии использовали глюкозу в концентрации 0,6% в контрольных условиях (нелимитированный рост) и 0,025% (для индукции стресса голода) в лимитированных условиях. Исчерпание глюкозы происходило в середине экспоненциальной фазы роста. Измерение оптической плотности и расчет удельной скорости роста проводили традиционными методами.

Измерения с использованием электрохимических ион-селективных сенсоров проводили непосредственно в колбах с растущими культурами. Все параметры непрерывно и синхронно обрабатывались в режиме реального времени с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего различные блоки регистрации. Парциальное давление кислорода ($dO_2$) измеряли с помощью электрода Кларка (Mettler Toledo) на модифицированном контроллере BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., USA). Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного халькогенидного электрода ХС-$S^{2-}$-001 (Sensor Systems Company, РФ), изменение редокс-потенциала (ОВП, Eh) регистрировали платиновым электродом («Измерительные Технологии», РФ). Концентрацию ионов экстраклеточного калия измеряли $K^+$-специфичным электродом ELIS-121K («Измерительные Технологии», РФ). Потенциометрические данные с этих сенсоров синхронно обрабатывались цифровыми pX-метрами срX-2 (ИБП, Пущино, РФ).

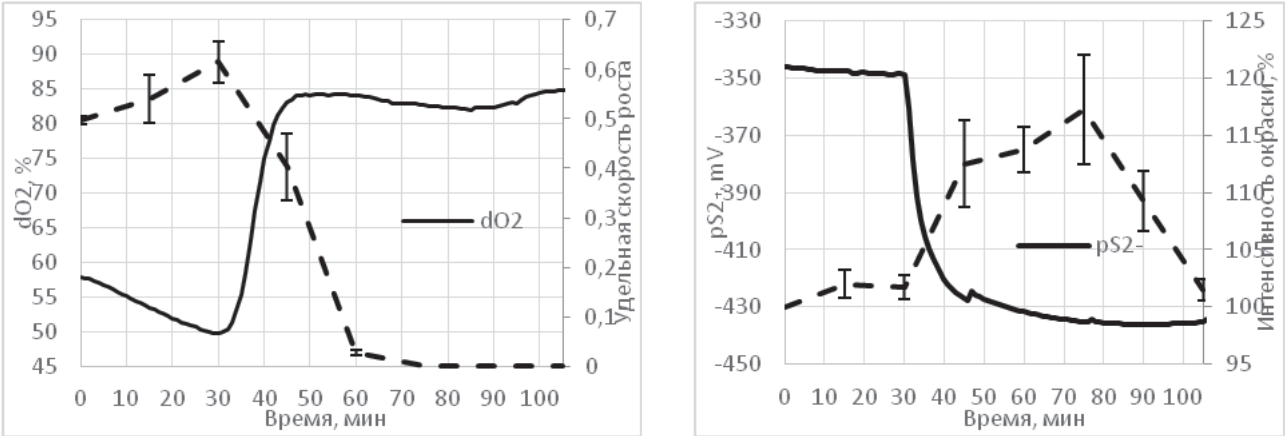
Детекцию газообразной формы сульфида водорода проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой бумажными полосками, пропитанными ацетатом свинца. Изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ, интенсивность выражали в процентах (Shatalin K *et al*., 2011, DOI: 10.1126/science.1209855).

При исчерпании источника углерода и энергии (через 2 часа от начала культивирования), бактерии прекращали рост, с падением удельной скорости роста (μ) с максимального до нулевого значения. Остановка роста сопровождалась быстрым повышением количества растворенного кислорода в среде, что свидетельствовало об ингибировании дыхательной активности клеток (рис. 1А). Одновременно наблюдалось резкое и необратимое падение потенциала сульфид-специфичного электрода на 72,8±6,2 мВ (510,6±11,7 нМоль), указывающее на стресс-индуцируемое повышение продукции эндогенного сульфида клетками.

Судя по усилению окраски индикаторных бумажных полосок, сульфид водорода в газовой форме активно выделялся в течение 45 минут от начала голодания, что коррелирует с показаниями сульфид-специфичного электрода (рис. 1Б).

Остановка роста сопровождалась падением Eh в область отрицательных значений. Профиль изменения Eh хорошо коррелировал с показаниями сульфид-специфичного электрода. В этих же условиях K+-специфичный электрод регистрировал постепенное увеличение уровня экстраклеточного калия, что свидетельствует о его выходе в среду.

С помощью двух независимых методов выявлена продукция сульфида водорода при стрессе голода, индуцируемом исчерпанием глюкозы в растущей культуре грамположительных бактерий *B. subtilis*. Синхронный мониторинг с применением электрохимических сенсоров в комплексе с традиционными методами позволил выявить тесную взаимосвязь между важными физиологическими параметрами на ранней стадии развития стресса. Важно отметить, что ранее подобный ответ на стресс голода наблюдался в культурах грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (Smirnova *et al.*, 2019, DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2).




А Б

**Рис. 1.** Изменение $dO_2$ и удельной скорости роста (А), pS2- и интенсивности окраски индикаторных бумажек (Б) при наступлении голодания по глюкозе (обозначено линией)

*Работа поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.*

# Секвенирование длинных прочтений по технологии Oxford Nanopore – эффективный инструмент для изучения организации бактериальных геномов с вариабельной структурой

*Делеган Я.А.[1], Кочаровская Ю.Н.[1,2], Французова Е.Э.[1,2], Соляникова И.П.[1,3]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт
[3] ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, mewgia@ya.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37953

В настоящее время секвенирование полных геномов является одним из основных подходов для определения генетической организации исследуемых организмов. Информация о последовательности и структуре полного генома позволяет с высокой точностью планировать молекулярно-биологические и генетические эксперименты.

Результатом секвенирования коротких прочтений (в основном по технологии Illumina) и последующей сборки являются протяжённые фрагменты – контиги, которые дают общее представление о геноме изучаемого организма. Тем не менее, воссоздать полные последовательности репликонов, особенно у штаммов с большим количеством повторов, мобильных генетических элементов (МГЭ) и коротких консервативных областей, с помощью секвенирования коротких прочтений практически невозможно даже при наличии референса – полностью собранного генома родственного организма.

Результатом секвенирования геномной ДНК по технологии Oxford Nanopore являются длинные прочтения, сборка которых позволяет с высокой точностью воссоздавать структуры полных репликонов даже в том случае, когда объектом исследования являются бактериальные геномы с большим количеством МГЭ и высококонсервативных повторяющихся областей. Коллективом авторов на оборудовании MinION (ONT) на базе лаборатории физиологии микроорганизмов выполняется секвенирование и сборка геномов различных актинобактерий (*Gordonia*, *Rhodococcus*), протеобактерий (*Pseudomonas*), а также дрожжей.

Выполнено секвенирование штамма *Rhodococcus (erythropolis)* VT6. Собранные последовательности всех репликонов были сравнены с ранее полученными коллективом авторов сборками штаммов *R. qingshengii* 7B [1] и *R. erythropolis* X5 [2]. Интересно отметить, что, несмотря на родство протяжённых участков ДНК, расположены они в геномах штаммов по-разному. При секвенировании штамма VT6 получено 1.716.067.812 нуклеотидов, распределённых по 171.434 прочтениям, из которых 130.800 (76.3%) имели качество Q > 10. Геном этого штамма имеет сложную структуру, включающую многочисленные МГЭ, а также внехромосомные генетические элементы. Геном состоит из хромосомы (6.464.421 п.н.) и 4 плазмид: 498 т.п.н., 187 т.п.н., 133 т.п.н. (кольц.), 100 т.п.н. (кольц.). Среднее покрытие – 120. Для коррекции мелких ошибок мы используем данные Illumina. Концы кольцевых элементов достоверно перекрываются.

Описанный в данной работе подход, включающий секвенирование длинных прочтений, сборку и анализ полученных данных, позволяет с достаточной точностью собирать не контиги, а полные репликоны, структура которых достоверно подтверждена. Коллектив авторов планирует расширять таксономическое разнообразие объектов, секвенируемых указанным методом, что позволит внести значительный вклад в изучение структур полных геномов микроорганизмов.

*Выполнено в рамках гранта Министерства науки и высшего образования РФ по соглашению № 075-15-2021-973 (28.09.2021-31.12.2021)*

## Литература

1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP063234.1
2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP044284.1


# Инженерия микробных продуцентов ценных изопреноидных синтонов на основе актинобактерий рода *Mycolicibacterium*


*Донова М.В., Ивашина Т.В., Довбня Д.В., Карпов М.В., Брагин Е.Ю., Стрижов Н.И.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
donova@ibpm.pushchino.ru; mv_donova@rambler.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37954


Биоконверсия растительных стеринов, – фитостеринов, в настоящее время является технологической основой промышленного производства ключевых предшественников, – так называемых «синтонов», из которых из которых далее с помощью комбинированных химико-микробиологических синтезов производят широкую номенклатуру изопреноидов стероидного и инданового ряда, включая кортикоиды, нейростероиды, половые гормоны, желчные кислоты и другие терпеноидные липиды, востребованные в фармацевтике, биомедицине, пищевой промышленности, ветеринарии, аквакультуре и сельском хозяйстве.

Наиболее эффективно фитостерины метаболизируются актинобактериями рода *Mycolicibacterium*, обладающими специфическими системами транспорта гидрофобных субстратов и активными полиферментными системами катаболизма стероидов. Полногеномное секвенирование и транскриптомное профилирование позволяют выявить наборы основных генов катаболизма стеринов, вовлеченные в окислительную деградацию боковой цепи, деградацию колец A/B и C/D стероидного ядра, и прояснить особенности организации генов у различных штаммов миколицибактерий [1].

Метаболическая инженерия стеринтрансформирующих миколицибактерий открывает возможности не только для улучшения биокаталитически свойств штаммов за счет подавления нежелательных активностей, приводящих к образованию побочных продуктов, но и позволяет перенаправлять метаболические потоки в клетке в сторону образования новых продуктов. Например, делеция в гене *fabG* у *M. neoaurum* позволяет эффективно получать 20-гидроксиметилпрегненон и его производные, а нокаут гена *fadD3* у штамма *M. smegmatis* mc$^2$ 155 способствует накоплению ценных соединений инданового ряда, востребованных в синтезе прогестинов (HIP и его производных). Улучшение биокаталитических свойств штаммов – продуцентов андростендиона (АД) достигается за счет инактивации генов *kstD*, кодирующих 3-кетостероид-1-дегидрогеназу, а дополнительное блокирование генов, кодирующих компоненты 9α-гидроксилазы, способствует предотвращению деструкции стероидного ядра. Улучшить биокаталитические свойства штаммов позволяет также введение мутаций в гены, кодирующие различные этапы синтеза основных компонентов клеточной оболочки миколицибактерий, например, миколиларабиногалактана или трегалозомиколатов, за счет увеличения проницаемости клеточной стенки для гидрофобных стероидных молекул [2]. Генетические модификации, направленные на интенсификацию основного обмена в клетках миколицибактерий, а также устранение ингибирования целевых процессов стероидными метаболитами обеспечивают повышение производительности промышленных штаммов [3].

Гетерологическая экспрессия генов чужеродных систем стероидогенеза в клетках миколицибактерий является еще одним перспективным направлением инженерии микробных продуцентов. Так, эффективная продукция мужского полового гормона – тестостерона обеспечивается ко-экспрессией генов 17β-гидроксистероиддегидрогеназы из гриба *Cochliobolus lunatus* и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы *M. tuberculosis* в клетках миколицибактерий. Экспрессия синтетического бицистронного оперона на основе 11α-гидроксилазной системы гриба *Rhizopus oryzae* в клетках мутантных штаммов *M. smegmatis*, проду-

цирующих андростендион (АД) или андростадиендион (АДД), позволяет получать из природных стеринов в качестве основных продуктов 11α-гидрокси-АД или 11α-гидрокси-АДД, соответственно [4]. Экспрессия генов *cyp106A1* и *cyp106A2* из *Bacillus megaterium* в генетически-модифицированном штамме *M. smegmatis* mc2155 (*ΔkshB*, *ΔkstD*) обеспечивает продукцию ценного 15β-гидрокси-АД [5]. Высоковостребованный гормон – прогестерон может быть получен в одну биотехнологическую стадию из холестерина путем экспрессии в *M. smegmatis* генов начального этапа стероидогенеза коры надпочечников быка в составе трицистронного оперона (CYP11A1-Ad-AdR), несущего гены цитохром-Р450-монооксигеназы Р450scc и его нативных редокс-партнеров – адренодоксина и адренодоксинредуктазы [6].

Таким образом, миколицибактерии обладают высоким потенциалом в инженерии промышленных микробных продуцентов стероидных соединений для фармацевтики, биомедицины, ветеринарии и агрохимии. Их применение открывает широкие перспективы промышленного применения для замещения многостадийных химических синтезов более экологически безопасными и экономичными одностадийными биотехнологиями.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 21-64-0024).*

## Литература

1. *Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Donova M.V.* Genome-wide response on phytosterol in 9-hydroxyandrostenedione-producing strain of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D. BMC Biotechnology, 2019, 19, 39 https://doi.org/10.1186/s12896-019-0533-7
2. *Xiong L.B., Liu H.H., Xu L.Q., Sun W.J., Wang F.Q., Wei D.Z.* Improving the production of 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one from sterols in Mycobacterium neoaurum by increasing cell permeability and modifying multiple genes. Microb Cell Fact 2017;16:89
3. *Zhao, X. Zhang, Y. Li, Z. Wang, Y. Lu, J. Md, A. Alam, W. Xiong, J. Xu. Mycolicibacterium* cell factory for the production of steroid-based drug intermediates, 2021, doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107860
4. *Felpeto-Santero C., Galan B., Garcia J.L.* Production of 11α-hydroxysteroids from sterols in a single fermentation step by *Mycolicibacterium smegmatis*. Microb Biotechnol, 2021, doi:10.1111/1751-7915.13735
5. *Карпов М.В., Николаева В.М., Довбня Д.В., Фокина В.В., Шутов А.А., Казанцев А.В., Стрижов Н.И., Донова М.В.* Создание и функциональная характеристика рекомбинантных штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*, экспрессирующих гены цитохромов CYP106A1 и CYP106A2 из *Bacillus megaterium*. Биотехнология, 2021 (в печати)
6. *Strizhov N., Fokina V., Sukhodolskaya G., Dovbnya D., Karpov M., Shutov A., Novikova L., Donova M.* Progesterone biosynthesis by combined action of adrenal steroidogenic and mycobacterial enzymes in fast growing mycobacteria. New Biotechnology, 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.1766.

# Гипертермофильная архея *Thermococcus sibiricus* – источник высокостабильной L-аспарагиназы для биомедицины и пищевых технологий

*Думина М.В.[1], Жгун А.А.[1], Покровская М.В.[2], Александрова С.С.[2], Жданов Д.Д.[2], Соколов Н.Н.[2], Эльдаров М.А.[1]*

[1] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва
DuminaMaria@gmail.com

[2] Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им, В.Н. Ореховича, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37955

Экстремофилы, проявляя устойчивость к различным экстремальным условиям внешней среды, являются естественным источником многих высокостабильных ферментов с широкими перспективами применения в биотехнологии [1]. На протяжении многих лет активно изучаются представители рода *Thermococcus* – филогенетически обособленной и самой многочисленной группы термофильных/гипер-

термофильных архей с широким диапазоном температур роста – 55–95 °С. С биотехнологической точки зрения это одна из самых перспективных групп экстремофильных микроорганизмов.

Для представителей рода *Thermococcus* в настоящее время описаны термостабильные ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, алкогольдегидрогеназы, пролидаза, бета-глюкозидаза, бета-D-глюкозамидаза и ряд других ферментов [2, 3].

Одним из важнейших для биотехнологии ферментов является L-аспарагиназа (L-АСП) [4]. L-АСП катализирует гидролиз амидной группы боковой цепи L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Это первый для клинической онкогематологии фермент со специфическим действием на опухолевые клетки. Препараты на его основе на протяжении нескольких десятилетий успешно применяются в терапии некоторых видов опухолей. L-АСП используются также в высокотемпературных процессах в пищевой промышленности для предотвращения образования потенциального канцерогена – акриламида. Еще одним направлением применения фермента является создание на его основе биосенсоров. Особенностью перечисленных областей являются повышенные требования к стабильности и активности фермента. Данные свойства характерны для ферментов экстремофильного происхождения.

Цель работы – гетерологичная экспрессия L-АСП экстремофильной археи *Thermococcus sibiricus,* характеристика биохимических свойств фермента, исследование цитотоксичности *in vitro.*

Предполагаемый ген, кодирующий L-АСП *T. sibiricus* (TsA), – TSIB_RS08165 был идентифицирован на основании депонированного в GenBank генома археи – NC_012883 [5].

Анализ аминокислотной последовательности TsA (331 а.о.) выявил гомологию с L-АСП архей *Thermococcus* sp. и *Pyrococcus* sp.: *Thermococcus litoralis* – 77%, *Thermococcus zilligii* – 62%, *Thermococcus gammatolerans* – 61%, *Thermococcus kodakarensis* – 63%, *Pyrococcus yayanosii* – 62%, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* – 56%. Уровень гомологии TsA с L-АСП неархейного происхождения не превышал 33%. В частности, сравнение с последовательностями коммерческих L-АСП из *E. coli* (препарат Elspar) и *Erwinia chrysanthemi* (препарат Erwinaze) выявило степень идентичности 28.5 и 29.6% соответственно.

Сравнение последовательностей L-АСП архей показало, что для TsA, как и для других L-АСП *Thermococcus* sp., Lys274, высококонсервативный для L-АСП *Pyrococcus* sp., заменен на глутаминовую кислоту, что может играть важную роль в повышении подвижности петли у L-АСП архей, принадлежащих *Thermococcu*s sp.

Для гетерологичной экспрессии TsA в *E. coli* разработали два варианта конструкций: для экспрессии нативной (*tsA*_wt) и оптимизированной по кодоновому составу (*tsA*_mod) нуклеотидных последовательностей L-АСП. Полученные синтетические последовательности гидролизовали по сайтам *Nhe*I/*Sal*I и встраивали в гидролизованный по сайтам *Nhe*I/*Sal*I вектор pET-28a(+) под контроль промотора гена 10 фага T7.

Экспрессия в *E. coli* BL21(DE3) показала, что только *tsA*_mod обеспечивал высокий выход активного целевого белка. Стадии выделения и очистки TsA из клеток штамма-продуцента методом ионообменной хроматографии позволили получить белок со степенью очистки 4.1 По результатам SDS-PAGE молекулярная масса белка составила 37.5 кДа.

Анализ субстратной специфичности TsA выявил высокую активность при гидролизе L-аспарагина – 2164.0 МЕ/мг, а также незначительную способность к гидролизу L-глутамина, не превышающую 7% от таковой для L-аспарагина.

Кинетические константы для TsA составили: $V_{max}$ 1200 мкМ/мин, $K_M$ 2.8 мМ.

L-АСП *T. sibiricus* при оптимуме 90 °С и pH 9.0 сохраняла высокую активность в широком диапазоне как температуры, так и pH независимо от буферной системы (рис. 1). TsA проявляла термостабильность: более 80% активности фермента регистрировали после 60-минутной инкубации при 60 °С, 86% – после 20 минут инкубации при 90 °С (рис. 1).

TsA демонстрировала высокую устойчивость к химической денатурации. Мочевина до концентрации 6М не приводила к значимому снижению активности фермента.

Исследование влияния ионов металлов и ЭДТА показало, что $Ni^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Ca^{2+}$, ЭДТА (1 мМ/л и 10 мМ/л) не оказывали ингибирующего эффекта на активность TsA. Однако добавление ионов $Fe^{3+}$ в концентрации 1 мМ/л и 10 мМ/л приводило к снижению активности фермента на 53.5% и более чем 85% соответственно (рис. 1).

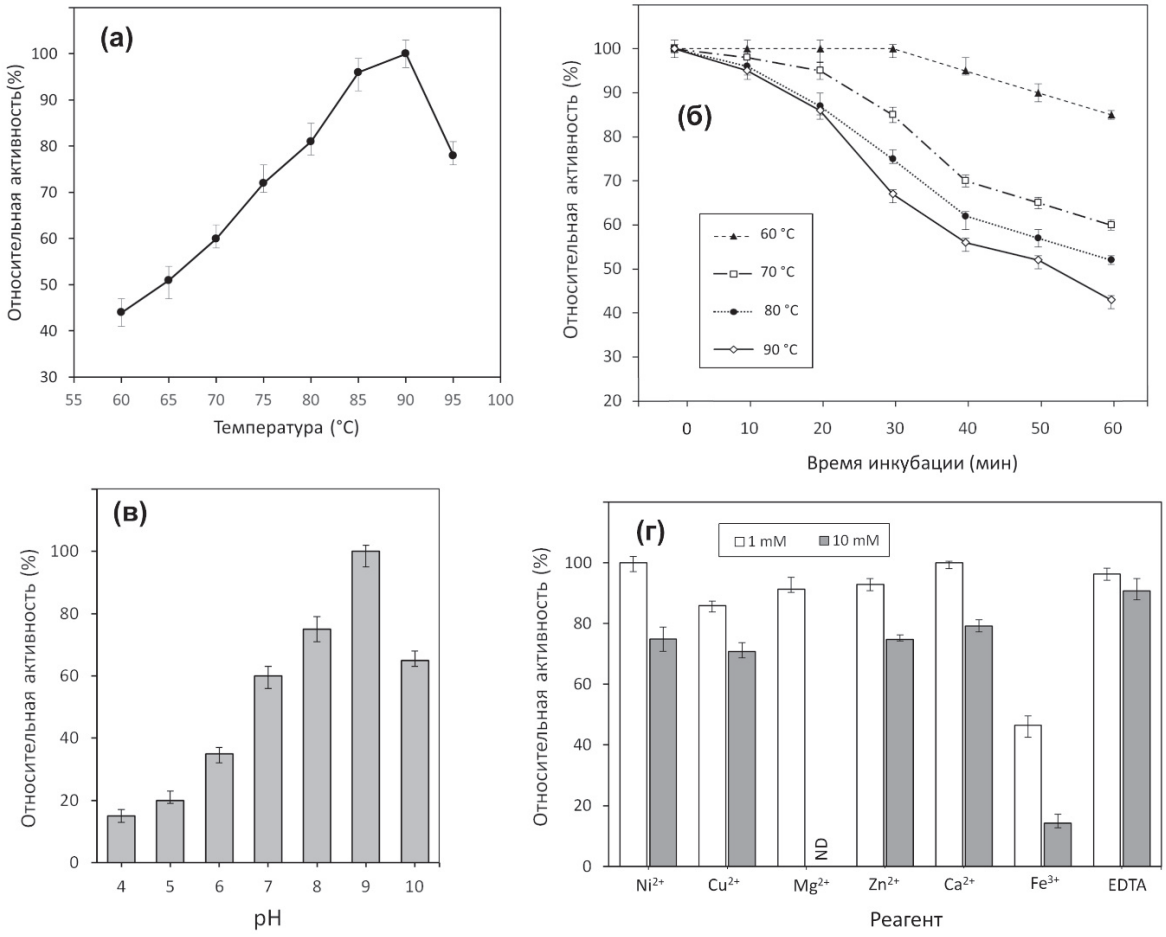



**Рис. 1.** Влияние температуры на (а) активность и (б) стабильность TsA. Стабильность выражена как остаточная активность (%) при инкубации длительностью 0-60 мин. Влияние (в) pH и (г) ионов металлов на каталитическую активность TsA, где ND – неопределенное значение

В предварительных экспериментах по изучению цитотоксичности TsA *in vitro* было установлено, что при физиологических условиях 37 °C, pH 7.1 активность фермента составляет 224 МЕ/мг, превосходя значение для коммерческой L-АСП II *E. coli* – 73 МЕ/мг [6].

Согласно экспериментальным данным, TsA проявляла цитотоксическую активность в отношении линий опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, карциномы легкого A549, миелоидной лейкемии человека K562. Наиболее чувствительными были клетки миелоидной лейкемии человека K562, наименее – клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 (табл. 1). Фибробласты человека WI-38 были практически нечувствительны к обработке TsA вплоть до высоких концентраций ~100 МЕ/мл.

*Таблица 1*

**Значения $IC_{50}$ и $IC_{90}$ при обработке TsA линий опухолевых клеток и нормальных фибробластов человека**

| Клеточная линия | $IC_{50}$, МЕ/мл | $IC_{90}$, МЕ/мл |
|---|---|---|
| K562 | 1.5 | 13.6 |
| A549 | 6.6 | 45.4 |
| Sk-Br-3 | 15.8 | 82.1 |
| WI-38 | 97.1 | >300 |

* Среднее значение из 8 МТТ-тестов.

**Выводы:** результаты гетерологической экспрессии ранее неохарактеризованной L-АСП *T. sibiricus* показали, что фермент, обладая высокой специфической активностью 2164 МЕ/мг, низкой нежелательной глутаминазной активностью (не более 7%), высокой термостабильностью, устойчивостью к химической денатурации, присутствию в среде ионов металлов, селективной цитотоксичностью в отношении линий опухолевых клеток, является перспективным для применения в биомедицине и пищевой промышленности.

## Литература


1. *Sarmiento F., Peralta R., Blamey J.M.* Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2015.
2. *Rolland J.L. et al.* Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon Thermococcus fumicolans // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 236, № 2.
3. *Marsic D., Flaman J.M., Ng J.D.* New DNA polymerase from the hyperthermophilic marine archaeon Thermococcus thioreducens // Extremophiles. 2008. Vol. 12, № 6.
4. *Dumina M.V. et al.* L-Asparaginases of Extremophilic Microorganisms in Biomedicine // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2020. Vol. 14, № 4.
5. *Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A. and Skryabin K.G.* Thermococcus sibiricus MM 739, complete genome [Electronic resource]. 2009. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012883.1.
6. *Yoshimoto T. et al.* Characterization of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from Escherichia coli and its application to therapy of leukemia // Jpn. J. Cancer Res. 1986.


# Роль малил-КоА лиазы – фермента серинового цикла ассимиляции углерода – у метанотрофов, реализующих различные варианты С1-ассимиляции


*Егорова С.В., Бут С.Ю.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
bohemianrhapsody12345@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37956


Аэробные метанотрофы представляют собой уникальную группу метилотрофных бактерий, которые могут использовать метан ($CH_4$) или метанол в качестве единственного источника углерода и энергии. Они относятся к классу *Proteobacteria* и филуму *Verrucomicrobia*. Метанотрофы класса *Proteobacteria* классифицируются как метанотрофы типа I или типа II, в зависимости от того, принадлежат они к γ- или α-классу *Proteobacteria*, соответственно.

Метанотрофы получают энергию, окисляя С1-субстрат до углекислого газа в нескольких последовательных реакциях, при этом промежуточные продукты, такие как формальдегид, формиат или $CO_2$, фиксируются посредством трех метаболических путей – рибулозомонофосфатного (РМФ), серинового или цикла Кальвина Гаммапротеобактериальные (тип Ia и тип Ib) ассимилируют углерод посредством РМФ пути, ключевые ферменты которого гексулозофосфатсинтаза и гексулозофосфатизомераза катализируют конденсацию формальдегида и рибулозо-5-фосфата с образованием фруктозо-6-фосфата, который далее вовлекается в метаболизм через гликолиз или путь Энтнера-Дудорова. При этом, метанотрофы рода *Methylococcus* (тип Ib) ассимилируют С1 соединения посредством рибулозо-монофосфатного пути, но также содержат частично функциональный цикл Кальвина. Альфапротеобактериальные метанотрофы (II тип) реализуют сериновый цикл. В сериновом пути формальдегид в виде $N_5$,$N_{10}$-метилен-тетрагидрофолата реагирует с глицином, образуя серин с участием серин-глиоксилатаминотрансферазы. Затем аминогруппа серина переносится серин-глиоксилатаминотрансферазой на глиоксилат с

образованием глицина и гидроксипирувата. Последний восстанавливается гидроксипируватредуктазой в $НАДН_2$-зависимой реакции в глицерат, который далее фосфорилируется глицераткиназой с участием АТФ в 2-фосфоглицерат, изомеризующийся далее в фосфоенолпируват (ФЕП). За карбоксилированием ФЕП следует восстановление оксалоацетата малатдегидрогеназой и образование малил-КоА с участием АТФ-малаттиокиназы. Далее малил-КоА-лиаза образует глиоксилат и ацетил-КоА, который, фактически, является первичным продуктом серинового пути, образующимся из формальдегида и $CO_2$. Метанотрофы древнего филума *Verrucomicrobia* ассимилируют углерод метана после окисления $CH_4$ в $CO_2$ через цикл Кальвина, который является единственным путем С1-ассимиляции.

С развитием технологий секвенирования и растущим количеством секвенированных геномов, стали открываться новые аспекты метаболизма, что позволяет пересмотреть устоявшиеся представления о метаболизме данной группы бактерий. Анализ доступных в базах данных геномов выявил присутствие генных кластеров, кодирующих ферменты серинового пути у всех представителей не только II, но также и у I типа метанотрофов. Судя по данным геномного и биохимического анализов, метанотрофы II типа используют сериновый цикл в качестве единственного пути ассимиляции углерода, в то время как у представителей Ib типа он функционирует как минорный наряду с РМФ и циклом Кальвина, а метанотрофы Ia типа, ассимилирующие основной углерод через РМФ цикл, имеют, по крайней мере, гены ферментов серинового пути, функциональность и роль которых остаются неясными.

Ранее нами для определения роли малил-КоА лиазы (*mcl*) у метанотрофа *Methylotuvimicrobium alcaliphilum* 20Z был получен мутант с инактивированным геном *mcl*. Оказалось, что штамм *Δmcl* способен расти только в присутствии глицина (0,1–1 мМ). Этот факт указывает на то, что сериновый путь является единственным источником глиоксилата у *Mtm. alcaliphilum* 20Z, который, в свою очередь, является единственным источником глицина, образуемого в реакциях трансаминирования [1].

На основании полученного мутантного штамма *Mtm. alcaliphilum*, было решено сделать аналогичное исследование метаболических изменений у мутанта, полученного на основе метанотрофа Ib типа *Methylococcus capsulatus* Bath, реализующего помимо РМФ и серинового цикла также цикл Кальвина. Полученные результаты помогут внести ясность в функции и роль одновременного присутствия нескольких путей С1-ассимиляции у гаммапротеобактериальных метанотрофов.

Таким образом, у метанотрофа *Mc. capsulatus* Bath был получен мутант с инактивированным геном *mcl.* Полученный мутантный штамм демонстрировал явный рост на жидкой среде, причем добавление глицина в среду увеличивало достигаемую оптическую плотность культуры в 2 раза, по сравнению с образцами без добавления глицина (рис. 1). Мы предполагаем, что кроме реакции, катализируемой малил-КоА лиазой, регенерация акцептора С1-единиц, глицина, может происходить как результат превращений фосфогликолата, образуемого в оксигеназной реакции Рубиско через гликолат и глиоксилат с участием фосфогликолатфосфатазы и гликолатоксидазы. Следовательно, у метанотрофов Ib типа сериновый путь не является единственным источником образования глицина/глиоксилата. В дальнейшем, у данного мутантного штамма будут сравнены накопления внутри- и внеклеточных метаболитов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-04-00493*

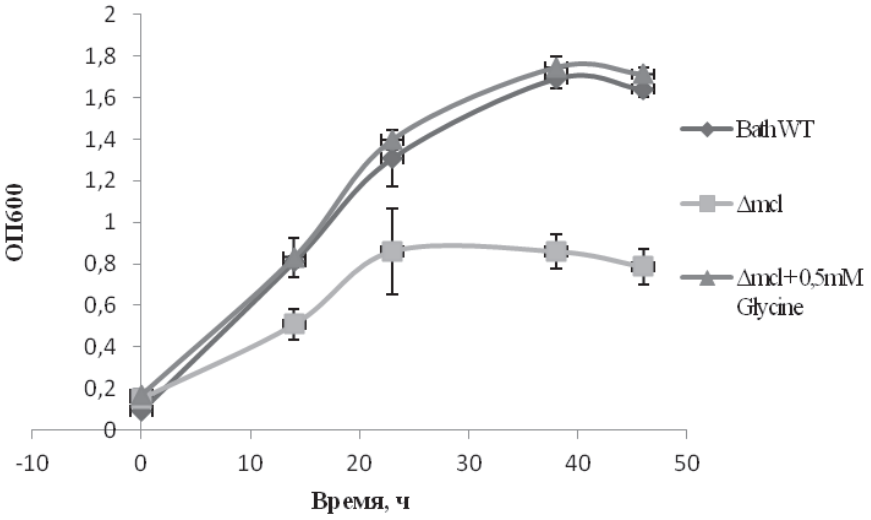



**Рис. 1.** Кривые роста дикого и мутантных штаммов *Mc. capsulatus* Bath

## Литература

1. *But S.Y., Egorova S.V., Khmelenina V.N., I.I. Mustakhimov.* Malyl-CoA lyase provides glycine/glyoxylate synthesis in type I methanotrophs // FEMS Microbiology Letters. 2020. Volume 367. https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa207


# Ключевые изменения, происходящие в геномах грибных продуцентов вторичных метаболитов после улучшений классическим методом


*Жгун А.А.*

ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва, zzhgun@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37957


Основным методом классического улучшения штаммов мицелиальных грибов для повышения продукции вторичных метаболитов является многораундовый случайный мутагенез и скрининг [1]. Этот метод относится к так называем классическим методам улучшения штаммов (CSI, classical strain improvement); он позволил, начиная с 1950-х, создать многочисленные промышленные грибные штаммы, с выходом целевых вторичных метаболитов в 100–1000 и более раз выше, по сравнению с исходными штаммами дикого типа. До последнего времени не было известно о молекулярных основах, тех положительных мутациях, отбираемых в процессе скрининга, совокупность которых может сделать из низкоактивного штамма дикого типа штамм-суперпродуцент по целевому вторичному метаболиту. Одной из пионерских работ явилось полногеномное исследование изменений, произошедших в процессе улучшения и влияющих на вторичный метаболизм β-лактамов, у штаммов *Penicillium chrysogenum* NRRL1951, Wisconsin 54-1255, DS17690 и DS68530, находящихся на разных стадиях улучшения в ходе одной программы CSI [2]. Среди множества мутационных изменений авторы выделили два основных класса изменений, приведших к суперпродукции пенициллина G (пенG) у DS17690, по сравнению с исходным штаммом NRRL1951. Это – i) мутации, приводящие к потере продукции ряда вторичных метаболитов, не связанных с продукцией β-лактамов, и ii) изменения в генах глобальной регуляции вторичного метаболизма, таких как LaeA, S-аденозилметионин-зависимой метилазы гистонов, или VelA, одиного из ключевых компонентов регуляторного комплекса Velvet грибов [2]. Роль этих мутационных изменений затем подтвердили в работе по сравнительному анализу экспрессии генов дикого типа и производственных штаммов *P. chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum* [3]. Цефалоспорины и пенициллины являются наиболее часто используемыми β-лактамными антибиотиками для лечения инфекций человека во всем мире. Улучшенные штаммы мицелиальных грибов *P. chrysogenum* и *A. chrysogenum* являются основными промышленными продуцентами для получения исходных субстанций, пенициллина G (пенG) и цефалоспорина C (цефC), используемых при синтезе всех антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового классов, соответственно [4]. Эти мицелиальные грибы таксономически не связанны между собой, были участниками долгосрочных программ разработки штаммов для достижения экономически значимых титров антибиотиков. Тот факт, что в ходе улучшений грибных штаммов различной таксономии отбираются принципиально сходные события на молекулярном уровне, может говорить о некой универсальности необходимых мутаций, требуемых для превращения грибного штамма дикого типа в суперпродуцент того или иного вторичного метаболита.

В связи с этим цель нашей работы была связана с характеристикой классов мутационных событий, произошедших в процессе улучшений высокоактивных штаммов *A. chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, продуцирующих цеф С и ловастатин (ЛОВ), соответственно, и попыткой их обощения.

В результате сравнения после SNP анализа геномной последовательности *A. chrysogenum* HY (BKM F-4081D) [5], у которого выход цефС увеличен более чем в 100 раз, с ранее опубликованной последовательностью исходного штамма дикого типа *A. chrysogenum* WT (ATCC 11500) [6] выявили 3730 различий, 56 из которых относятся к группе HIGH, 525 – к группе MODERATE, 373 – LOW и 2769 – MODIFIER. Важнейшие изменения связаны с: i) удалением различных «стресс-респонс» элементов (например,

сдвиг рамки считывания в гене сферулин-подобного белка, ответственного за осмотический стресс, ACRE_023410) – в результате делеций в генах белков, «включающихся» в ответ на различные стрессы; ii) максимальной «разгрузкой» внутриклеточного содержания S-аденозилметионина от использования в ряде путей метаболизма (например, биосинтезе аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты) – в результате делеций в метаболизирующих ферментах (например, сдвиг рамки считывания в гене аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты синтазы подобного белка, ACRE_065750; iii) удалением биосинтеза альтернативных (целевому) вторичных метаболитов – делециями в биосинтетических генах альтернативных вторичных метаболитов (например, нонсенс мутация в гене нонакетид синтазы биосинтеза ловастатина, Lov B, ACRE_060650; или нонсенс мутация в гене грамицидина С синтазы, ACRE_012290); iv) изменения в системе ремоделирования хроматина (например, сдвиг рамки считывания в гене каталитического компонент ISW2-комплекса подобного белка, ACRE_068240); v) множественные изменения в протеин-киназах (например, сдвиг рамки считывания в гене протеин-киназы подобного белка, GenBank ACRE_078410), цитохромах P450 (например, сдвиг рамки считывания в гене питазин деметилазы подобного белка, CYP57, GenBank ACRE_061140) и другие изменения. Не обнаружили изменений, затрагивающие биосинтетические «ранний» и «поздний» кластер генов бета-лактамов.

Сравнение после SNP анализа геномной последовательности *A. terreus* HY (№ 43-16) [7], у которого выход ЛОВ увеличен более чем в 200 раз, с опубликованной последовательностью штамма дикого типа *A. terreus* NIH2624 (GenBank: ASM14961v1, RefSeq: NZ_AAJN00000000.1) выявил 2871 различий, относящихся к группе HIGH (сдвиг рамки считывания, нонсенс мутации, нарушения сплайсинга, потери стартового или стоп кодонов). Основные изменения оказались связанными с: i) биосинтезом ацетил-КоА (строительном блоком при биосинтезе ЛОВ) и ацетилированием; ii) биосинтезом холестерина (нарушения в генах цитохрома P450 51 и дельта(14)-стерол редуктазы); iii) глобальной регуляцией (делеции в генах *pac*C, регулятора pH, *creA*, регулятора углерода и в гене негативного регулятора митоза); iv) биосинтезом клеточной стенки (нарушение в гене хитин-синтазы); v) биосинтезом полиаминов (делеция в гене аргиназы); vi) разгрузкой потребления S-аденозилметионина, необходимого для биосинтеза LOV (делеция в гене дифтинсинтазы). Также не обнаружили изменений, затрагивающие биосинтетический кластер генов ловастатина. Полученные данные позволили всесторонне охарактеризовать высокоактивный продуцент LOV и объяснить ряд экспериментальных феноменов, например, потерю способности трансформировать андростендион.

В нашей работе среди массы мутационных изменений, произошедших в процессе улучшения грибных штаммов *A. chrysogenum* и *Aspergillus terreus* методом случайного мутагенеза удалось выделить несколько основных групп, связанных с биосинтезом вторичных метаболитов. К первым двум группам относятся ранее описанные события, связанные с i) инактивацией альтернативных путей вторичного метаболизма и ii) изменениями в системе глобальной регуляции. Кроме того, наши данные указывают на значительные и общие для двух улучшенных продуцентов изменения в iii) метаболизме серы и метилировании, а также, iv) в системе ацетилирования, в частности, на уровне инактивации целой группы реакций, расходующих S-аденозилметионин, и изменений в биосинтезе ацетил-кофермента А, соответственно. Полученные данные важны для понимания молекулярных основ улучшения грибных штаммов, с последующей целью направленного получения высокоактивных продуцентов.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173*

## Литература

1. *Zhgun A.A.* Random Mutagenesis of Filamentous Fungi Stains for High-Yield Production of Secondary Metabolites: The Role of Polyamines // Genotoxicity and Mutagenicity – Mechanisms and Test Methods, Chapter 2. / ed. Soloneski S., Larramendy M.L. IntechOpen, 2021. P. 25–41.
2. *Salo O. V et al.* Genomic mutational analysis of the impact of the classical strain improvement program on β-lactam producing Penicillium chrysogenum. // BMC Genomics. BioMed Central, 2015. Vol. 16. P. 937.
3. *Terfehr D., Dahlmann T.A., Kück U.* Transcriptome analysis of the two unrelated fungal β-lactam producers Acremonium chrysogenum and Penicillium chrysogenum: Velvet-regulated genes are major targets during conventional strain improvement programs. // BMC Genomics. BioMed Central, 2017. Vol. 18, № 1. P. 272.
4. Global beta-lactam and beta-lactamase inhibitors market 2030 forecast [Electronic resource]. URL: https://www.statista.com/statistics/1257527/worldwide-beta-lactam-and-beta-lactamase-inhibitors-market-size/ (accessed: 29.10.2021).

5. *Bartoshevich Y. et al.* Patent RU 2426793 C12P035/06, C07D501/02, C12R001/75. Method of cephalosporin C biosynthesis by using new Acremonium chrysogenum strain RNCM NO F-4081D. 2011.
6. *Terfehr D. et al.* Genome Sequence and Annotation of Acremonium chrysogenum, Producer of the β-Lactam Antibiotic Cephalosporin C. // Genome Announc. 2014. Vol. 2, № 5. P. e00948-14-e00948-14.
7. *Dzhavakhija V.G., Voinova T.M., Vavilova N.A., Santsevich N.I., Vinokurova N.G., Kadomtseva V.M., Dzhavakhija V.V.* M.A. Patent RU 2261901C2. Fungus strain Aspergillus terreus 44-62 as producer of lovastatin, industrial method for isolation of lovastatin and method for lactoninization of statins.

# Поиск и определение консервативности некодирующих РНК, участвующих в регуляции метаболизма азота, в геноме *Pseudomonas putida* BS3701

*Иванова Е.В.[1], Позднякова-Филатова И.Ю.[2]*

[1] Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино,
ivanova05evgenia99@yandex.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37958

У микроорганизмов в условиях дефицита азота интенсивнее начинают работать промоторы, активность которых связана с наличия сигма$^{54}$-субъединицы РНК-полимеразы и белком-активатором NtrC. Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 (NZ_CP059052.1), содержит гены деструкции нафталина.

В условиях дефицита азота количества мРНК этих генов значительно увеличивается. Однако в области upstream у них не обнаружено сайта связывания NtrC, а механизм регуляции процесса пока неясен. В связи с этим был проведен поиск некодирующих РНК, участвующих в регуляции метаболизма азота, в геноме *Pseudomonas putida* BS3701 и последующее определение консервативности.

В качестве целевых РНК были выбраны малые некодирующие регуляторные РНК, предсказанные с помощью программ prokka 1.14.6 [5] и PresRAT [1]. В области upstream этих РНК с помощью программы SigmoID [3] был обнаружен NtrC – зависимый энхансер, а с помощью iPro54-PseKNC $\sigma^{54}$ [2] – зависимый промотор. В итоге было отобрано 22 нкРНК.

С помощью программы SyntTax [4] был проведен поиск гомологичных локусов для генов находящихся upstream и downstream от выбранных нкРНК. Для анализа использовали 5 видов, у которых отобрали по 4 штамма (табл.1)

*Таблица 1*

**Штаммы для определения консервативности**

| Вид | Штамм | Вид | Штамм |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | NCTC 10332 | *Pseudomonas putida* | KT2440 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | PAO1 | *Pseudomonas putida* | NBRC 14164 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | LESB 58 | *Pseudomonas stutzeti* | ATCC 14405 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Carb01_63 | *Pseudomonas stutzeti* | CGMCC1_1803 |
| *Pseudomonas fluorescens* | ATCC 13525 | *Pseudomonas stutzeti* | F2 |
| *Pseudomonas fluorescens* | JNU01 | *Pseudomonas stutzeti* | NCTC 10475 |
| *Pseudomonas fluorescens* | NCTC 10038 | *Pseudomonas syringae* | BIM_B268 |
| *Pseudomonas fluorescens* | SBW25 | *Pseudomonas syringae* | CAS02 |
| *Pseudomonas putida* | B1 | *Pseudomonas syringae* | U643 |
| *Pseudomonas putida* | BS3701 | *Pseudomonas syringae* | Susan762 |

В итоге было обнаружено, что у некоторых нкРНК (cobalamin_19770, PpBS_43580, ncRNA20, ncRNA137, ncRNA277, ncRNA292, ncRNA350, ncRNA453) отсутствуют гомологичные локусы генов upstream и downstream у ряда штаммов. Так же у генов upstream и downstream ncRNA64, ncRNA86, ncRNA296, ncRNA446 в ряд штаммов отсутствуют синтенные блоки. Из оставшихся 10 наиболее консервативными являются nrsZ, narK, rsmZ, ncRNA144 и ncRNA311.

## Литература


1. *Kumar K., Chakraborty A., & Chakrabarti S.* (2020). PresRAT: a server for identification of bacterial small-RNA sequences and their targets with probable binding region. RNA Biology, 18(8), 1152–1159. doi:10.1080/15476286.2020.1836455
2. *Lin H., Deng E.-Z., Ding H., Chen W., & Chou, K.-C.* (2014). iPro54-PseKNC: a sequence-based predictor for identifying sigma-54 promoters in prokaryote with pseudo k-tuple nucleotide composition. Nucleic Acids Research, 42(21), 12961–12972. doi:10.1093/nar/gku1019
3. *Nikolaichik Y., Damienikan A.U.* 2016. SigmoID: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. PeerJ 4:e2056. doi.org/10.7717/peerj.2056
4. *Oberto J.* (2013). SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. BMC Bioinformatics, 14(1), 4. doi:10.1186/1471-2105-14-4
5. *Seemann T.* (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics, 30(14), 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153


# Эволюционная стабильность микроорганизма глубинной подземной биосферы


*Кадников В.В.[1], Марданов А.В.[1], Карначук О.В.[2], Равин Н.В.[1]*

[1] Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, vkadnikov@bk.ru
[2] Томский государственный университет, Томск



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37959


Знание механизмов, скоростей и последствий микробной эволюции имеет важное значение для широкого круга научных и практических задач, таких как профилактика и лечение заболеваний человека, биоремедиация окружающей среды, исследования глобальных биогеохимических циклов и понимание разнообразия жизни в целом. Наши текущие представления об эволюции микроорганизмов большей частью основаны на результатах исследований в области сравнительной геномики и экспериментальной эволюции, объектами которых являлось небольшое число быстро размножающихся видов. Микроорганизмы в подобных лабораторных эволюционных экспериментах растут в среде, богатой источниками энергии и питательными веществами, имеют время генерации, исчисляемое минутами-днями, и в результате могут накапливать нуклеотидные замены и приобретать новые гены в течение нескольких лет или даже быстрее. Однако такие микроорганизмы могут быть неадекватными моделями для многих бактерий и архей, которые иметь очень разные жизненные стратегии, влияющие на скорость их эволюции.

Изолированные от поверхности Земли глубинные подземные экосистемы по разным оценкам содержат около 10% общей биомассы биосферы и содержат значительную долю еще не охарактеризованного микробного биоразнообразия, так называемой «микробной темной материи». Многие из этих микроорганизмов являются хемолитоавтотрофами, развивающимися в условиях низкой доступности ростовых субстратов, в результате чего время генерации может исчисляться месяцами и даже десятилетиями. Фирмикут *Candidatus* Desulforudis audaxviator MP104C стал одним из модельных микроорганизмов глубинной подземной биосферы. Первоначально эта бактерия была обнаружена в водах золотодобывающей шахты в Южной Африке на глубине 2.8 км, где она была единственным микроорганизмом. Анализ ге-

нома этой бактерии, полученного в результате секвенирования метагенома, показал, что *Ca.* Desulforudis audaxviator может расти хемолитоавтотрофно, фиксируя углерод по пути Вуда-Люнгдаля, окисляет образуемый в результате радиолиза воды водород, и восстанавливает сульфат. Помимо южноафриканской шахты, последовательности 16S рРНК *Ca.* Desulforudis audaxviator были обнаружены только в нескольких подземных местообитаниях.

Мы исследовали микробное сообщество глубинных термальных водоносных горизонтов, залегающие на глубинах 2–3 км в мезозойских осадочных породах Западно-Сибирского региона. В результате метагеномного анализа в сообществе был обнаружен *Ca.* Desulforudis audaxviator и определен его полный геном [2]. Идентичность нуклеотидных последовательностей геномов Сибирского и Южноафриканского штаммов *Ca.* Desulforudis audaxviator составляла свыше 99.99%. Последующий анализ геномов 126 единичных клеток *Ca.* Desulforudis audaxviator из глубинных подземных экосистем в Западной Сибири, Южной Африке и Северной Америки, а также культивированного изолята *Ca.* Desulforudis audaxviator из Западной Сибири, выявил высокую степень консервативности геномов, проявляющуюся в высокой гомологии нуклеотидных последовательностей вне зависимости от географического расстояния и сходстве CRISPR локусов [3, 4]. Последнее особенно удивительно, поскольку CRISPR локусы обычно считаются одной из наиболее быстро эволюционирующих областей генома, отражающих «историю» взаимодействия микроорганизма с вирусами.

Столь высокое сходство между геномами *Ca.* Desulforudis audaxviator является неожиданным, поскольку три континента, в глубинных местообитаниях которых он был обнаружен, разошлись более 100 миллионов лет назад, а физико-химические условия экологических ниш и микробные сообщества, в которых он обитает, значительно отличаются. *Ca.* Desulforudis audaxviator представляет яркий контраст с существующими модельными организмами, используемыми в исследованиях микробной эволюции, которые развивают адаптивные черты в течение коротких периодов времени.

Результаты сравнительного геномного анализа длительно изолированных популяций *Ca.* Desulforudis audaxviator требуют переоценки некоторых предположений об эволюции микроорганизмов. Например, длительные периоды очень медленной эволюции могут повлиять на калибровку «молекулярных часов», топологию предполагаемых филогенетических взаимосвязей и определение стандартизированных пороговых значений дивергенции геномных последовательностей для построения микробной таксономии. Предполагаемая высокая точность механизмов репликации и репарации ДНК *Ca.* Desulforudis audaxviator может найти практическое применение в биотехнологии. Поскольку на подземную биосферу приходится значительная часть всего микробного биоразнообразия, можно ожидать, что *Ca.* Desulforudis audaxviator – не единственное «живое ископаемое» в этих местообитаниях, предоставляющее новую информацию об истории жизни.

*Работа поддержана Российским научным фондом (проект 19-14-00245).*

## Литература

1. *Chivian D., Alm E., Brodie E., Culley D., Dehal P., DeSantis T., et al.* Environmental genomics reveals a single species ecosystem deep within the Earth. Science. 2008; 322: 275–8.
2. *Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y.A., et al.* A metagenomic window into the 2 km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition. FEMS Microbiol Ecol. 2018; 94: fiy152.
3. *Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., et al.* Domestication of previously uncultivated Candidatus Desulforudis audaxviator from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution. ISME J. 2019; 13: 1947–59.
4. *Becraft E.D., Lau Vetter M.C.Y, Bezuidt O.K.I, Brown J.M., Labonté J.M., Kauneckaite-Griguole K., Salkauskaite R., Alzbutas G., Sackett J.D., Kruger B.R., Kadnikov V., van Heerden E., Moser D., Ravin N., Onstott T., Stepanauskas R.* Evolutionary stasis of a deep subsurface microbial lineage. ISME J. 2021; 15(10): 2830-42.

# Конструирование химерных белков иммунитета Im9, чувствительных к протеазе pS273R вируса африканской чумы свиней

*Калинин Д.С.[1,2], Ефимов А.В.[3], Каява А.В.[4], Шляпников М.Г.[1], Соловьев И.Д.[2], Грановский И.Э.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), 309163@gmail.com
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН
[3] Институт белка РАН
[4] Centre de Recherches de Biochimie Macromolйculaire, CNRS, France

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37960

Данная работа направлена на разработку нового подхода к получению пород сельскохозяйственных животных, устойчивых к вирусным инфекциям. Предлагаемый подход основывается на вовлечении в этот процесс вирус-кодируемых протеаз. Для этого предполагается провести такую модификацию клеток хозяина, чтобы вирус-кодируемые протеазы запускали каскад реакций, приводящий к деградации геномной ДНК вируса неспецифической нуклеазой. Исследования проводятся на модели вируса африканской чумы свиней (АЧС). Вирус АЧС – это крупный, оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией и двухцепочечным ДНК геномом размером от 170 до 190 т.п.н. Вирус АЧС вызывает контагиозную геморрагическую болезнь свиней с летальностью близкой к 100%. На территории Российской Федерации первые вспышки АЧС зафиксированы в 2008 г. и продолжаются вплоть до настоящего времени. Разработка эффективной вакцины от АЧС оказалось трудно решаемой задачей. В этой связи активно развивается альтернативное направление, связанное с получением пород сельскохозяйственных животных, генетически устойчивых к определенному инфекционному заболеванию.

Цель данной работы является разработка и апробация подхода, основанного на активации неспецифической нуклеазы колицина E9 (Col E9) протеазой pS273R вируса АЧС. Природным ингибитором активности колицина E9 является белок иммунитета Im9. Для этого в природный ингибитор активности колицина E9, белок иммунитета Im9, будет введен сайт протеазы pS273R вируса АЧС. Предполагается, что при инфицировании вирусом АЧС, вирус-кодируемая протеаза pS273R будет расщеплять рекомбинантный белок иммунитета и, тем самым, активировать колицин Col E9.

Первоначально, нами был сконструирован модифицированный белок иммунитета mIm9, в который содержал сайт протеазы pS273R в положении P56 – D60. Анализ показал, что он также, как и природный белок, обладает способностью эффективно ингибировать активность колицина E9. Модифицированный белок иммунитета специфически расщепляется протеазой pS273R *in vitro* и при этом теряет свои ингибирующие свойства. на основе химеры TagRFP-mIm9-TagYFP был сконструирован FRET-сенсор для детекции активности протеазы pS273R вируса АЧС, в том числе в клетках млекопитающих. Тем не менее, при формировании комплекса модифицированного белка иммунитета mIm9 с колицином E9 сайт, введенный в положение P56 – D60 белка иммунитета, становится недоступен для гидролиза вирусной протеазой. В связи с этим нами были сконструированы три варианта белка иммунитета Im9, содержащие сайт вирусной протеазы в альтернативных участках белковой последовательности. Модифицированные белки иммунитета были очищены и исследована их способность расщепляться протеазой pS273R вируса АЧС как сами по себе, так и в комплексе с колицином E9. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования протеазы pS273R для активации комплекса «белок иммунитета – колицин E9» *in vitro*.

# Проблема недостаточности данных в Генбанке NCBI

*Калинина А.Е.[1], Кудряшова Т.Р.[1], Филатов П.В.[1], Аронова Е.Б.[1], Крюков А.А.[2], Юрков А.П.[2]*

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, 7359572@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37961

Арбускулярная микориза (АМ) является наиболее распространенным растительно-микробным симбиозом, который может способствовать усвоению минеральных питательных веществ и регулировать внутривидовую и межвидовую конкуренцию в растительных сообществах. Биопрепараты на основе грибов АМ (АМГ) можно использовать как альтернативу внесению больших количеств фосфорных удобрений.

АМГ являются облигатными симбиотическими грибами и должны культивироваться *in vivo*, для поддержания коллекции штаммов АМГ требуется хорошо изученная растительно-микробная система. В ФГБНУ ВНИИСХМ для такой системы используется предположительно *Plectranthus australis R.Br.*

Наиболее часто для молекулярно-генетической идентификации грибов АМ применяются методы секвенирования Next Generation Sequences (NGS), в частности с использованием прибора Illumina MiSeq. Ранее в полученных результатах с АМ грибами не были обнаружены последовательности растения-хозяина.

Основная сложность морфологического анализа данного растения обусловлена отсутствием фазы цветения в условиях поддержания коллекции АМГ.

Проведенный позднее молекулярно-генетический и таксономический анализ результатов после секвенирования методом Сэнгера растительного материала 3 образцов растения-хозяина после выделения ДНК из листьев указал на низкий процент эффективности генетической идентификации рода *Plectranthus* по последовательностям ITS, не смотря на то, что это общепринятый баркод для цветковых растений. Последовательностей ITS для рода *Plectranthus* в генбанке оказалось слишком мало для анализа.

Цель работы: используя статистические методы анализа выяснить наиболее используемые маркеры для молекулярно-генетической идентификации *Plectranthus* и растения, применяемого для поддержания коллекции штаммов АМГ института. Также планируется проведение молекулярно-генетического анализа исследуемого образца по различным молекулярным маркерам. Статистические данные по используемым молекулярным маркерам при генетической идентификации растений рода *Plectranthus* по данным Генбанка:

| Маркер | Частота использования |
|---|---|
| trnS gene&trnS- trnG intergenic spacer | 64% |
| ribosomal protein S16 (rps16) | 64% |
| tRNA-Leu gene&trnL- trnF intergenic spacer | 57% |
| ITS1&ITS2 | 36% |
| maturase K (matK) gene, chloroplast | 21% |
| ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene (rbcL) | 21% |
| ribosomal protein L32 (rpL32) gene | 7% |
| K-like gene, chloroplast | 7% |
| rpoC1 gene, chloroplast | 7% |
| rpoB gene, chloroplast | 7% |

*Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, а также РФФИ №20-016-00245.*

# Секвенирование генома и анализ путей первичного метаболизма метанола у нового представителя рода *Ancylobacter*

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

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), lenokap80@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37962

Аэробные метилотрофные бактерии (метилобактерии) – обширная группа микроорганизмов, обладающая уникальной способностью использовать окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии, но не метан. В настоящее время известно более 50 родов метилобактерий, выполняющих уникальную функцию природного биофильтра в цепи метаболических превращений летучих $C_1$-соединений в атмосферу. Среди них можно выделить представителей рода *Ancylobacter*, участвующих в биоремедиации дихлорметана, сульфонилмочевины, мышьяка, в детоксикации и разложении галогенированных алифатических соединений, биодеградации остаточной глюкоизосахариновой кислоты промышленного производства крафт-бумаги и др. (Firsova et al., 2009; Chemodurova et al., 2020). Некоторые из штаммов рода *Ancylobacter* выделены из растений и являются фитосимбионтами (Агафонова с соавт., 2014; 2017).

Из активного ила городских очистных сооружений г. Москва выделен новый штамм 3С = ВКМ В-3218, который на основании секвенирования гена 16S рРНК имеет наибольшее сходство (98–99%) с представителями родов *Starkeya* и *Ancylobacter* семейства *Xanthobacteraceae* и является претендентом на новый вид.

Цель данной работы: секвенирование генома нового штамма и анализ путей первичного метаболизма метанола.

Секвенирование геномной ДНК нового штамма 3С проводили с использованием платформы Illumina HiSeq2500 (“Illumina Inc.”, США). Для сборки генома использовали программу SPAdes версии 3.13.0. Геном штамма 3С содержал 13 контигов, покрывающих в общей сложности 4 179 879 п.н., с содержанием G+C пар 68,2%. Депонирован в DDBJ / ENA / GenBank под номером VMBP00000000 (версия VMBP01000000).

Аннотацию генома выполняли с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP; v. 4.7), всего было предсказано 3888 генов, 3791 белок-кодирующих генов, 44 псевдогена, 53 гена РНК и 46 тРНК. Анализ функциональных генов проводили с использованием сервера RAST v.2.0, с последующим сравнением генов с базами данных NCBI.

Значения ANI и dDDH, рассчитанные для последовательностей геномов штаммов 3С (VMBP01000000) и ближайшим представителем рода *Starkeya*: *S. novella* DSM 506$^T$ (CP002026.1), составили 86,4% и 28,3%, соответственно, что значительно ниже пороговых значений (95–96% ANI и 70% dDDH) для разграничения видов (Meier-Kolthoff et al., 2013; Chun et al. 2018).

Все известные представители рода *Ancylobacter* являются факультативными метилотрофами, используют широкий спектр полиуглеродных соединений наряду с $C_1$-соединениями (метанол, метиламин, формиат) в качестве источников углерода и энергии. Нами проведен геномный анализ путей первичного метаболизма метанола у нового штамма 3С, который способен окислять метанол до формальдегида двумя разными метанолдегидрогеназами (МДГ). Идентифицирован полный оперон, кодирующий классическую МДГ *mxaBYHFJGIRSACKLDE* (FO470_09335 – FO470_09405), и ген лантаноид-содержащий тип XoxF-МДГ *xoxFGJ* (FO470_11125-11135). Далее выявлены гены, кодирующие ферменты окисления промежуточных продуктов деградации метанола: формальдегида (*fae*, FO470_11060; FO470_11650) и формиата (*fdh*2; FO470_02820-02840; *fdh*3; FO470_00990-01005), в т.ч. НАД$^+$-зависимая формиантдегидрогеназа (FO470_18215).

Кроме того, показано наличие в геноме тетрагидрофолат (ТГФ) (FO470_11590, FO470_09885; FO470_09880; FO470_12010; FO470_11630; FO470_12015; FO470_09980; FO470_03205; FO470_16820) и тетрагидрометаноптерин (ТГМП) (FO470_11590- FO470_11600; FO470_11570-11575; FO470_11560-

11565; FO470_11585; FO470_11605-11620; FO470_11525-11545; FO470_11595) -зависимых метаболических модулей $C_1$-переноса между формальдегидом и формиатом.

Одной из важных характеристик метилотрофных бактерий является определение пути $C_1$-ассимиляции, ответственного за биосинтез клеточных компонентов при метилотрофном росте бактерий. Штамм 3С реализует рибулозобисфосфатный (РБФ) путь $C_1$-метаболизма, в котором $CO_2$ фиксируется в реакции карбоксилирования рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием 3-фосфоглицерата. В геноме обнаружены гены всех ферментов цикла Кальвин-Бенсон-Бассема: фосфорибулокиназа (FO470_15935), рибулозобисфосфаткарбоксилаза (*cbbLM*, FO470_15950-15955), фосфоглицераткиназа (FO470_16915), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (FO470_16920), триозофосфатизомераза (FO470_13360), фруктозобисфосфатальдолаза (FO470_15945), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (FO470_15930), транскетолаза (FO470_15940), рибулозофосфат-3-эпимераза (FO470_15965), рибозо-5-фосфатизомераза (FO470_08480).

Таким образом, полногеномное секвенирование показало принадлежность исследуемого штамма к новому виду, а с помощью анализа путей первичного метаболизма выявлено, что окисление метанола до $CO_2$ может проходить в несколько этапов: метанол окисляется до формальдегида двумя PQQ-зависимыми метанолдегидрогеназами (MxaF и XoxF); формальдегид далее окисляется до формиата по ТГФ и ТГМП путями, формиат превращается в $CO_2$ формиатдегидрогеназами, а источником углерода для конструктивного метаболизма служит $CO_2$, ассимилированный в цикле Кальвина-Бенсона-Бассама.

## Оптимизация процедуры выделения РНК из углеводородокисляющих родококков

*Комарова Л.П.[1], Ширяева Е.Н.[2], Криворучко А.В.[1,2]*

[1] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, dulika5365@gmail.com

[2] Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Пермь

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37963

Актинобактерии рода *Rhodococcus* – сравнительно сложный объект для молекулярно-биологических исследований. Родококки обладают жёсткой липофильной клеточной стенкой, которая требует разрушения для эффективной экстракции нуклеиновых кислот (Bell *et al*., 1999; Sazykin *et al*., 2019). Молекулы РНК наименее устойчивы к химическим и физическим воздействиям при экстракции (Handbook of Nucleic Acid., 2009). Цель настоящей работы – оптимизировать методику выделения РНК из клеток *Rhodococcus* spp. для изучения экспрессии генов в условиях роста родококков в присутствии углеводородов и их производных.

В работе использовали штаммы *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. cerastii* ИЭГМ 1243 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM #768, ЦКП № 480868, УНУ № 73559, www.iegmcol.ru). Бактерии выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США), минерально-солевой среде К или RS с 0,1–3,0 об.% *н*-гексадекана или 0,01% ибупрофена (Sigma-Aldrich, США) и 0,1−0,2% глюкозы при 160 об/мин, 28 °С в течение 1–7 сут, либо на агаризованной среде К в парах *н*-гексадекана, пристана, ксилола, нафталина или фенантрена при 28 °С в течение 3–28 сут. Для усиления метаболизма и синтеза РНК родококки выращивали на агаризованной среде К без внесения источника углерода и энергии при 28°С в течение 24–48 ч, затем в среде LB с двойной концентрацией питательных веществ, ×2 LB (Handbook of Nucleic Acid., 2009). Клетки разрушали с использованием 20 мг/мл лизоцима (Helicon, Москва) при 37 °С в течение 1 ч, затем дробно добавляли 10% додецилсульфат натрия (SDS) до получения прозрачного раствора. РНК выделяли тризольным методом с использованием TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию РНК определяли с помощью нанофотометра NanoPhotometer® N50 (Implen, Германия). ОТ-ПЦР проводили с использованием набора реактивов MMLV (Евроген, Москва). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров к

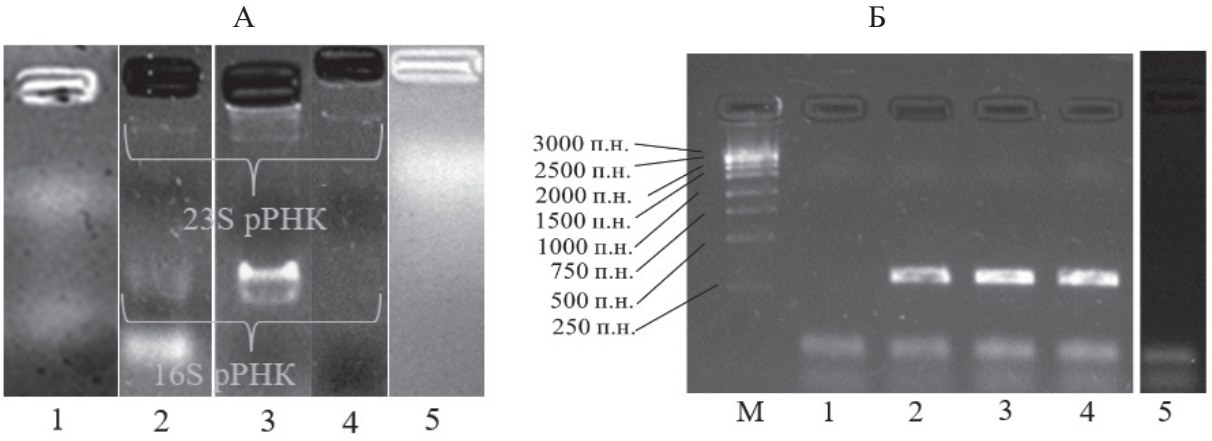



**Рис.** Электрофореграммы РНК (А) и ПЦР-продуктов с праймерами к гену 16S рРНК (Б) из родококков. Варианты опыта: 1 – интактные, нелизированные клетки *R. ruber* ИЭГМ 231; 2–5 – клетки после лизиса с лизоцимом и SDS (2 – 1-суточная культура R. ruber ИЭГМ 231 в LB, 3 – 3-суточная культура *R. ruber* ИЭГМ 231 в LB, 4 – 3-суточная культура *R. ruber* ИЭГМ 231 на агаризованной среде К с н-гексадеканом, 5 – 3-суточная культура R. cerastii ИЭГМ 1243 в среде с ибупрофеном). М – маркер молекулярного веса ДНК

гену 16S рРНК и кДНК в качестве матрицы (Bell *et al*., 1999). Все эксперименты проводили в трех-восьмикратной повторности.

Установлено, что использование лизоцима и SDS приводит к разрушению бактериальных клеток и способствует экстракции РНК независимо от возраста культуры и среды культивирования. По нашим данным, из интактных (нелизированных) клеток *Rhodococcus*, а также из клеток, растущих в присутствии ибупрофена, РНК не выделяется (рисунок). Для этих клеток характерно сохранение целостности клеточной стенки, что свидетельствует о необходимости лизирования клеток перед выделением РНК и является подтверждением того, что в средах с токсичными соединениями родококки образуют более гидрофобную клеточную стенку (Ившина и др., 2021). Обработка клеток лизоцимом без SDS и предварительное культивирование их в среде без источника углерода и энергии с последующим выращиванием в ×2 LB также позволяют получать препараты РНК, однако эти подходы менее эффективны и не всегда приводят к выделению РНК. На примере конститутивного гена, кодирующего у родококков синтез 16S рРНК, показано, что полученная РНК целая и пригодна для анализа экспрессии целевых генов (рисунок). Исключение составляют препараты РНК из родококков, выращенных в жидкой среде с *н*-гексадеканом. В этих условиях РНК разрушается и на ее матрице не происходит синтеза кДНК. Известно, что углеводороды связываются с молекулами РНК, снижают их стабильность и ингибируют ПЦР (Irianni-Renno *et al*., 2021). Требуется проведение дальнейших исследований для подбора условий выделения РНК из родококков, растущих в средах с жидкими *н*-алканами и труднодоступными экополлютантами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ АААА-А19-119031890083-9) и Российского научного фонда (№ 21-14-00132, https://rscf.ru/project/21-14-00132/).*

## Литература

1. *Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А.* Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. УрО РАН, 2021. 140 с.
2. *Bell K.S., Kuyukina M.S., Heidbrink S., Philp J.C., Aw D.W.J., Ivshina I.B., Christofi N.* Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. 1999. Vol. 87. P. 472–480.
3. Handbook of Nucleic Acid Purification / ed. Liu D. Boca Raton, USA: CRC Press, 2009. 584 pp.
4. *Renno M.I., Sale T.C., De Long S.K.* Advanced methods for RNA recovery from petroleum impacted soils // MethodsX. 2021. Vol. 8:101503.
5. *Sazykin I., Makarenko M., Khmelevtsova L., Seliverstova E., Rakin A., Sazykina M.* Cyclohexane, naphthalene, and diesel fuel increase oxidative stress, *CYP153*, *sodA*, and *recA* gene expression in *Rhodococcus erythropolis* // Microbiol. Open. 2019. 8:e855.

# Выделение и характеристика состава капсульного полисахарида и липополисахарида почвенных ростстимулирующих ассоциативных бактерий *Azospirillum griseum* L-25-5 w-1

*Кондюрина Н.К.[1], Сигида Е.Н.[2], Бурыгин Г.Л.[2], Федоненко Ю.П.[1,2]*

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», natasha.kondyurina@gmail.com

[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37964

Бактерии рода *Azospirillum* – представители альфа-протеобактерий – являются модельным объектом микробиологических и биохимических исследований, направленных на изучение растительно-бактериальных ассоциативных взаимодействий [1]. В настоящее время насчитывается 22 вида азоспирилл, большинство из которых образуют ассоциации на корнях растений-хозяев, в том числе представителей ценных сельскохозяйственных культур. При формировании симбиотических отношении с растениями, равно как и при любых контактных взаимодействиях с макро- и микроорганизмами, непосредственное участие принимают макромолекулы поверхности бактериальных клеток, среди которых существенную долю занимают различные гликополимеры. Для бактерий р. *Azospirillum* показано, что преобладающими компонентами поверхности клеток являются капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды наружной мембраны (ЛПС) [2, 3]. При этом КПС азоспирилл является внеклеточной формой ЛПС, продуцируемой бактериями в комплексе с белками (поринами). ЛПС представляют собой гликоконъюгаты, состоящие из гидрофобного домена – липида А, корового олигосахарида и О-специфического полисахарида (ОПС) – самой вариабельной части молекулы, ответственного за О-антигенные свойства. По структуре полисахаридного компонента ЛПС и КПС гомологичных штаммов азоспирилл чаще идентичны, и лишь для некоторых штаммов показаны отличия в структуре и антигенных свойствах полисахаридов ЛПС и КПС [2, 3].

Исследования гликополимеров поверхности азоспирилл активно ведутся в течение 30 лет, однако конкретные функции этих макромолекул во взаимодействии данных бактерий с другими организмами ещё не выяснены до конца. В связи с этим, накопление сведений об особенностях структурной организации ЛПС и КПС *Azospirillum* spp. остается актуальной задачей.

Объектом исследования настоящей работы являлись бактерии типового штамма *Azospirillum griseum* L-25-5 w-1 – нового вида азоспирилл, выделенного из вод озера Байян (Байяндянь, Китай) в 2019 году [4]. Выделение и анализ гликополимеров поверхности осуществляли по общему протоколу, используемому при установлении структуры ЛПС и КПС. Бактерии были выращены в жидкой селективной синтетической среде с малатом натрия в качестве источника углерода до экспоненциальной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием (3000×g, 30 мин), ресуспендировали в физиологическом растворе, механически перемешивали (троекратно, 3 сут), каждый раз переосаждая клетки бактерий, и заменяя промывающий раствор. Клетки высушивали ацетоном. Супенатанты, содержащие КПС, объединяли, концентрировали на вакуумном испарителе (Laborota 4000 «Heidolph», Германия), диализовали против дистиллированной воды, вновь концентрировали и лиофилизировали (BenchTop 2K «VirTis», США). Выход лиофилизированного КПС составил 32% от массы клеток. Экстракцию ЛПС из ацетонового порошка бескапсульных клеток проводили методом Вестфаля без разделения слоёв. После диализа ЛПС концентрировали и осаждали примеси белков 40% ТХУ до конечного pH 2,7. Экстракт ЛПС вновь диализовали, концентрировали и лиофилизировали. Выход ЛПС после лиофилизации составил 11,4% от массы сухих клеток. Методом ДСН-электрофореза в 13,5% ПААГ установили, что в обоих полимерах ЛПС представлен S-формой молекул, т.е. в его составе содержатся все три функциональные части молекулы (липид А, кор, высокомолекулярный ОПС).

При иммунохимическом тестировании ЛПС бактерий *A. griseum* с антителами к ЛПС штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и к КПС *A. lipoferum* Sp59b, серологические перекрестные реакции с которыми обуславливают отнесение азоспирилл к серогруппам I, II и III [5], было показано, что исследуемый ЛПС демонстрировал серологический перекрест в реакции двойной иммунодиффузии в агарозе и иммуноферментном анализе с кроличьими анти-КПС-антителами *A. lipoferum* Sp59b. Эти данные позволяют отнести исследуемый штамм к серогруппе III азоспирилл.

Содержание 2-кето-3-дезоксиоктоновой кислоты (КДО) определялось колориметрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия) и составило 0,45±0,05% для ЛПС. Для измерения содержания белка в КПС использовался метод Бредфорда, доля белковой компоненты составила 13,5±1,1%.

Состав и соотношение жирных кислот липидов А в виде их метиловых эфиров определяли ГЖХ с использованием хроматографа GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённого капиллярной колонкой EQUTY-1. К преобладающим жирным кислотам исследованных образцов ЛПС и КПС можно отнести 14:0 (3-OH), 16:0 (3-OH), 16:1, 16:0 и 18:1.

Мягким кислотным гидролизом ЛПС и КПС и последующей гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50 выделен ОПС с выходом 32%. Анализ ОПС с привлечением методов ГЖХ ацетатов полиолов и ацетилированных 2-(R)-октилгликозидов, полученных после полного кислотного гидролиза, и $^{1}$H и $^{13}$C ЯМР-спектроскопии позволил определить структуру его повторяющегося звена, представленного линейный тетрарамнаном:

→2)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→. Ранее регулярный полисахарид с установленной в данной работе структурой не был обнаружен среди гликанов бактериального происхождения.

## Литература


1. *Turkovskaya O.V., Golubev S.N.* The collection of rhizosphere Microorganisms: its importance for the study of associative plant-bacterium interactions Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020; 24(3):315-324 DOI 10.18699/VJ20.623.
2. *Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Макаров О.Е., Игнатов В.В.* Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilence* на состав их внеклеточных полисахаридсодержащих материалов // Изв. РАН Сер. биол. 2003. Вып. 4. С. 430–437.
3. *Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Hampel M., Okon Y.* Aggregation in Azospirillum brasilense: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components // Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 1989–1999.
4. *Yang Y, Zhang R, Feng J, Wang C, Chen J. Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater. Int J Syst Evol Microbiol. 2019 Dec;69(12):3676-3681.
5. *Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А., Игнатов В.В.* Структура и серология О-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum.* Изв. Акад. наук. Сер. хим., 2015, № 5 С. 1024–1031.


# Молекулярные факторы адгезии углеводородокисляющих родококков


*Криворучко А.В.[1,2], Куюкина М.С.[1,2], Ившина И.Б.[1,2]*

[1] Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН), Пермь, nast@iegm.ru

[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37965


Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны к деструкции широкого спектра углеводородных соединений, что обусловливает перспективность их использования в технологиях биоремедиации нефтезагрязненных экосистем. Адгезия клеток к твердым поверхностям и друг к другу (агрегация) рассматри-

вается как фактор защиты *Rhodococcus* spp. от токсического действия углеводородов и их производных (Ившина и др., 2021; Pátek *et al*., 2021). Однако механизмы адгезии родококков практически не изучены. Цель настоящей работы – исследование молекулярных факторов адгезии углеводородокисляющих родококков.

В работе использовали 84 штамма *Rhodococcus* spp. из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM #768, ЦКП № 480868, УНУ № 73559, http://www.iegmcol.ru) и 118 Tn5-мутантов *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне или минерально-солевой среде RS с 3 об.% *н*-гексадекана при 160 об/мин, 28 °С в течение 28–240 ч. В качестве подложек для прикрепления клеток использовали 96-луночные полистироловые микропланшеты (Медполимер, Санкт-Петербург) или сосновые опилки. Адгезивную активность родококков оценивали фотометрически после окрашивания прикрепленных клеток кристаллическим фиолетовым. Количество общих липидов в клетках определяли согласно стандартной методике. О продукции гликолипидных биосурфактантов судили по показателю эмульгирующей активности клеток. Количество биосурфактантов в культуральной жидкости определяли гравиметрически после экстракции метилтрет-бутиловым эфиром (Kuyukina *et al*., 2001). Биосурфактанты в концентрации от 0,0001 до 5 вес.% использовали для направленной модификации физико-химических свойств подложек. Расположение клеток и профили поверхности подложек после модификации исследовали с помощью профилометра-интерферометра высокого разрешения New View 5000 (Zygo, США). О степени вовлеченности поверхностных белков в адгезионный процесс судили по изменению адгезивной активности родококков после их инкубации в присутствии 0,2 мкг/мл протеиназы К в течение 3 ч и в экспериментах с ингибиторами синтеза белка (эритромицином и олеандомицином), которые вносили в среду в концентрации 0,4–12,5 мкг/мл. Локализацию адгезинов и силы адгезионных взаимодействий исследовали с помощью атомно-силового микроскопа MFP-3D-BIO™ (Asylum Research, США). Все эксперименты проводили в трех-восьмикратной повторности.

Установлено, что основными факторами, регулирующими адгезию родококков в присутствии жидких углеводородов, являются гликолипидные биосурфактанты. Адгезивная активность *Rhodococcus* spp. зависит (R = 0,92, $p$ = 0,03) от продукции данных соединений. Получены Tn5-мутанты, обладающие повышенной (индекс эмульгирования *н*-гексадекана 85, 23 и 18% через 1, 24 и 168 ч соответственно) эмульгирующей активностью по сравнению с родительским штаммом (индекс эмульгирования *н*-гексадекана 67, 15 и 5% через 1, 24 и 168 ч соответственно). Показатели адгезии Tn5-мутантов к полистиролу в 2–3 раза превышают таковые клеток дикого типа и Tn5-мутантов, не способных к образованию стабильных эмульсий *н*-гексадекана в воде. Сила адгезии *Rhodococcus*-биосурфактантов к полистиролу составляет 0,495±0,010 нН, что сопоставимо с силой адгезии миколовых кислот (Geoghegan *et al*., 2008)

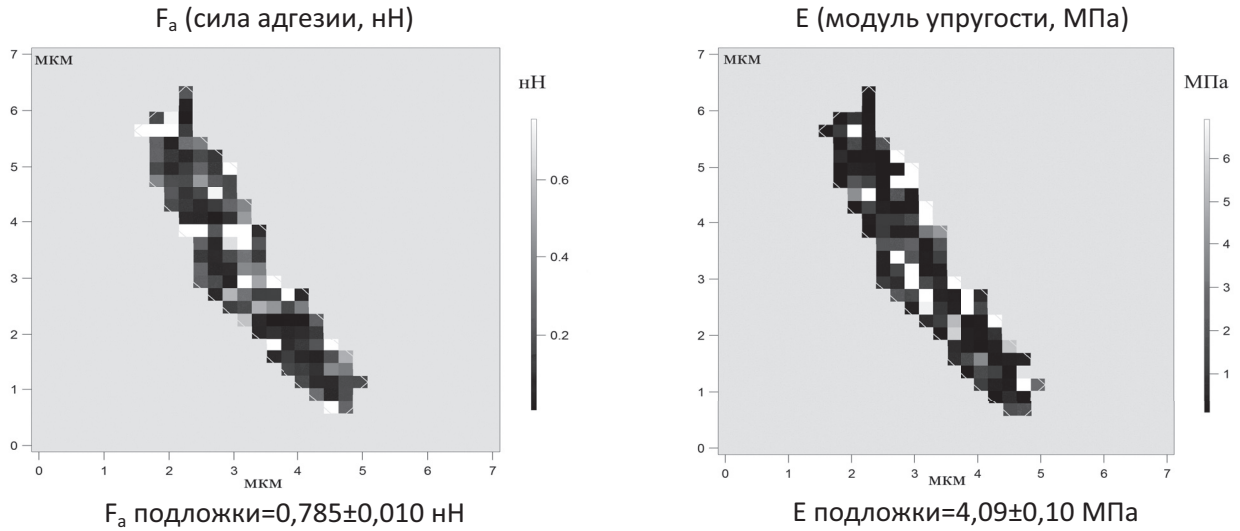



**Рис.** Карты распределения сил адгезии зонда атомно-силового микроскопа и модуля упругости на поверхности единичной клетки *R. opacus* ИЭГМ 57. Участки с $F_a$ > 0,6 нН и E > 6,0 МПа соответствуют специфическим придаточным структурам клеточной стенки

и в 20 раз превышает таковую полисахаридов и белков (Wright, Armstrong, 2006). Биосурфактанты образуют на твердой поверхности «кондиционирующие пленки», способствующие 2–3-кратному увеличению числа прикрепленных клеток *Rhodococcus*, их равномерному расположению и созданию наиболее оптимальных (70% биодеградации *н*-гексадекана) условий окисления углеводородов. Установлено, что в присутствии *н*-гексадекана в клетках *Rhodococcus* spp. в 2–4 раза повышается количество общих клеточных липидов. Это приводит к двукратному увеличению степени гидрофобности клеток и образованию клеточных агрегатов, однако не влияет на способность родококков к адгезии к твердым поверхностям. У 18 штаммов установлено участие в адгезии поверхностных белков. Показано, что расположение адгезинов приурочено к специфическим придаточным структурам клеточной стенки родококков длиной 400–600 нм и диаметром 45–100 нм, обладающим повышенной силой адгезии (>0,6 нН) и модулем упругости (>6 МПа) (рисунок).

*Исследования выполнены в рамках госзаданий АААА-А19-119112290008-4, АААА-А19-119112290010-7, АААА-А19-119031890083-9 и при поддержке грантов РНФ 21-14-00132 и РФФИ 20-44-596001.*

## Литература

1. *Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А.* Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.
2. *Geoghegan M., Andrews J.S., Biggs C.A., Eboigbodin K.E., Elliott D.R., Rolfe S., Scholes J., Ojeda J.J., Romero-González M.E., Edyvean R.G.J., Swanson L., Rutkaite R., Fernando R., Pen Y., Zhang Z., Banwart S.A.* The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion // Faraday Discuss. – 2008. – Vol. 139. – P. 85–103.
3. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Cristofi N., Dunbar S.A., Richkova M.I.* Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J Microbiol Methods. – 2001. – Vol. 46. – P. 149–156.
4. *Pátek M., Grulich M., Nešvera J.* Stress response in *Rhodococcus* strains // Biotechnol Adv. – 2021. – 107698.
5. *Wright C.J., Armstrong I.* The application of atomic force microscopy force measurements to the characterisation of microbial surfaces // Surf Interface Anal. – 2006. – Vol. 38. – P. 1419–1428.

# Экофизиологические свойства штаммов *Aspergillus niger*, выделенных из облученных и необлученных образцов пустынных почв

*Крючкова М.О.[1,2], Иванова А.Е.[2,3], Воробьёва Е.А.[2,4]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
margo_kruchkova@mail.ru
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
[3] Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва
[4] Институт космических исследований РАН, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37966

*Aspergillus niger* van Tieghem 1867 – это широкораспространенный, эвритопный вид, известный своей устойчивостью к разнообразным, в том числе, экстремальным экологическим воздействиям (Domsch et al., 1980). Методом посева была исследована структура почвенных грибных сообществ контрольных и облученных (γ-лучи, 0,1 и 1 МГр) образцов двух пустынных почв. *A. niger* являлся видом-доминантом в облученных образцах. Кроме того, изоляты данного вида присутствовали как в контрольных, необлученных почвенных образцах, так и в облученных, причем, в обеих исследованных почвах. Таким образом, для анализа экофизиологических особенностей был выбран вид *A. niger*.

Облучение образцов горной серо-коричневой почвы (горная пустыня, Марокко)и серозема (пустыня Негев, Израиль) было проведено в июле 2014 года на базе физико-технического института имени Йоф-

фе, Санкт-Петербург на гамма-установке К – 120000 с источником $^{60}$Co внутри цилиндрического облучателя в режиме -50 °C, 1 Topp (Cheptsov et al., 2018). Мощность дозы в месте облучения составляла 5 кГр/час. Образцы серозема и горной серо-коричневой почвы облучали разными суммарными дозами – 0,1 и 1 МГр, соответственно.

Производили посев 4-х штаммов *A. niger* – из контрольных и облученных образцов серозема и горной серо-коричневой почвы. Анализировали особенности роста грибных колоний на агаризованной минеральной питательной среде Чапека при разном содержании органического вещества (глюкозы – 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 10%), при разных температурах (5; 9; 10; 11; 12; 15; 25; 37; 42; 43,5; 44,5; 45; 46; 47; 50; 65 °C) и влажности ($a_w$ = 0,7; 0,72; 0,74; 0,76; 0,77; 0,78; 0,79; 0,8; 0,81; 0,82; 0,83; 0,84; 0,9; 0,95). Для температурного и влажностного диапазонов отмечали наличие роста и диаметр колоний, при росте на среде с разным содержанием глюкозы измеряли радиальную скорость (Kr) роста колоний.

Kr в экспоненциальной фазе всех штаммов *A. niger* при отсутствии глюкозы в среде была одинакова и равна примерно 0,14 мм/час. При низких концентрациях глюкозы в среде (от 0% до 0,5%) Kr у 4-х исследованных штаммов *A. niger* значимо не различалась. У всех изученных штаммов *A. niger* регистрировали резкое увеличение значения Kr в экспоненциально фазе при 10% глюкозы в среде в 1,5–2 раза. Возрастание радиальной скорости роста сопровождается сокращением длительности экспоненциальной фазы роста колоний, и наоборот, при снижении скорости роста может наблюдаться увеличение длительности фазы роста.

Значимые изменения Kr у штаммов регистрируются при повышенном содержании глюкозы в среде (1%, 2% и 10%). Отличия между значениями Kr у штаммов из облученной и необлученной почв при повышенной концентрации глюкозы в среде выявлены только для серозема (с облучением меньшей дозой в 0,1 МГр).

Облучение почв γ-лучами приводит к небольшому изменению температурного диапазона роста грибов вида *A. niger*, выделенных из этих почв (увеличению при облучении дозой в 0,1 МГр и уменьшению при воздействии дозой в 1 МГр), расширению оптимума роста (чем больше доза воздействия, тем больше оптимум) и значительному изменению диаметра колоний при оптимальной температуре роста (увеличению при облучении дозой в 0,1 МГр и уменьшению при воздействии дозой в 1 МГр).

Облучение почвы γ-лучами дозой в 0,1 МГр приводит к возрастанию устойчивости вида, расширению оптимума роста и уменьшению размера колоний при оптимальной влажности у гриба вида *A. niger*, выделенного из этой почвы. Облучение почвы γ-лучами дозой в 1 МГр влияет только на оптимальный для роста *A.niger*, выделенного из этой почвы, диапазон влажности, который значительно сужается.

На примере *A. niger* выявлены отличия в динамике роста штаммов из гамма-облученных и необлученных почв при культивировании в широком диапазоне концентрации источника углерода (глюкозы), температуры и влажности. Штамм из облученного меньшей дозой (0,1 МГр) образца серозема проявил более высокую скорость роста и имел укороченную фазу экспоненциального роста при высоких концентрациях глюкозы (2–10%), а также был более устойчив к низким значениям температуры и влажности. Штамм из облученного большей дозой (1 МГр) образца серо-коричневой почвы имел удлиненную фазу экспоненциального роста (при 10% глюкозы) и был менее устойчив к низким значениям температуры и влажности.

## Литература


1. *Cheptsov V.S, Vorobyova E.A., Osipov G.A., Manucharova N.A., Polyanskaya L.M., Gorlenko M.V., Pavlov A.K., Rosanova M.S., Lomasov V.N.* 2018. Microbial activity in martian analog soils after ionizing radiation: implications for the preservation of subsurface life on Mars//AIMS MICROBIOLOGY. 4(3):541–562.
2. *Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H.* 1980. Compendium of soil fungi. P. 672.

# Разработка гомологичной системы экспрессии для β-литической протеазы *L. capsici* VKM B-2533$^T$

*Кудрякова И.В.[1], Афошин А.С.[1], Леонтьевская Е.А.[1], Леонтьевская Н.В.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
kudryakovairina@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37967

Внеклеточные бактериолитические ферменты бактерий гидролизуют пептидогликан – основной структурный компонент клеточных стенок бактерий, приводя к лизису клеток-мишеней. Изучение этих ферментов в качестве основы антимикробных лекарственных средств затруднено из-за отсутствия эффективной экспрессионной системы для них. Ранее нами был выделен перспективный для биомедицины стафилолитический белок β-литическая протеаза (Blp) *L. capsici* VKM B-2533$^T$. Разработка экспрессионной системы на основе чужеродных бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pLysE и *Pichia pastoris* GS115 не была успешной. Перспектива решения существующей проблемы просматривалась в разработке гомологичной системы экспрессии для Blp, что явилось целью данной работы.

В качестве экспрессионного штамма использовали *L. capsici* VKM B-2533$^T$. Для конструирования экспрессионного вектора была выбрана плазмида pBBR1-MCS5. Скрининг промоторов был осуществлен с использованием флуоресцентного маркерного белка – GFP. Были апробированы несколько промоторов: бактериальный промотор GroEL, в том числе и с модификацией GroEL(A) (был добавлен нуклеотид A, что увеличило расстояние от старт-кодона до области Шайна – Дальгарно). Введение рекомбинантных плазмид в *L. capsici* VKM B-2533$^T$ осуществлялось методом электропорации, отбор клонов производился на селективной среде LB с Gm. В результате было выявлено, что интенсивность флуоресценции у рекомбинантных штаммов *L. capsici*, экспрессирующих *gfp* под регуляцией промоторов GroEL и GroEL(A), в 19 и 44 раз соответственно больше по сравнению с показателями клеток *L. capsici* дикого типа. В результате применения классических методов клонирования был сконструирован экспрессионный вектор на основе pBBR1-MCS5: ген *blp* под регуляцией промотора GroEL(A). В результате электропорации и селекции на LB среде с Gm получен штамм *L. capsici blp* $P_{GroEL(A)}$. Проведенный сравнительный анализ уровня экспрессии гена *blp* методом RT-qPCR показал, что уровень экспрессии *blp L. capsici blp* $P_{GroEL(A)}$ в 246 раз выше по сравнению с *L. capsici* дикого типа. Была проведена очистка Blp по разработанной ранее нами схеме: осаждение 80% сульфатом аммония с последующей очисткой с применением катионообменной хроматографии (CM Toyopearl, EnrichS) и гель-фильтрации (Superdex 75). Выход белка *L. capsici blp* $P_{GroEL(A)}$ составил 13.755 мг/л, что в 10.5 раз выше по сравнению с *L. capsici* дикого типа.

Таким образом, впервые разработана успешная гомологичная система экспрессии для перспективного стафилолитического фермента Blp *L. capsici* VKM B-2533$^T$. Дальнейшая работа будет направлена на получения высокоэффективной гомологичной системы экспрессии для перспективных бактериолитических белков.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Проект № 19-74-0086).*

# Анализ экспрессии нескольких SWEET-генов транспортеров сахаров у *Medicago lupulina* в процессе развития эффективной арбускулярной микоризы в условии стресс-фактора

*Кудряшова Т.Р.[1], Калинина А.Е.[1], Филатов П.В.[1], Крюков А.А.[2], Горбунова А.О.[2], Иванченко О.Б.[1], Юрков А.П.[2]*

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, tahacorfu@yandex.ru
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37968

Транспортеры углеводов у растений играют значительную роль в их продуктивности, поскольку с их помощью координируются и осуществляются потоки сахаров от листьев к органам потребления (семена, плоды, цветок и корень), а также с их помощью регулируется часть обмена питательными веществами с микроорганизмами ризосферы (бактериями и грибами), что позволяет формировать симбиотические отношения. Растительные транспортеры сахаров относятся к трем ключевым семействам – SUT (SUC), MST (включая подсемейства STP, TMT, PMT, VGT, pGlct/SGB1, ESL, INT) и SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) [1].

В результате образования АМ-симбиоза с грибами подотдела Glomeromycotina растение получает от микосимбионта микроэлементы, главным образом фосфор, а гриб – продукты ассимиляции углерода. Единственным известным сейчас семейством транспортеров углеводов, в котором согласно современным представлениям могут быть выявлены белки, специфичные для развития АМ-симбиоза, является семейство SWEET, которое было описано в 2010 году Л.К. Ченем [2]. В тоже время, анализ литературных данных позволяет заключить, что многие растительные транспортеры сахаров не обладают специфичностью для АМ [2, 3].

Транспортеры SWEET могут также играть роль в устойчивости к абиотическим стрессам, позволяя растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды [4].

Экспрессия многих SWEET генов меняется под воздействием факторов на растение, например, в условиях дефицита воды экспрессия генов *MtSWEET3a, MtSWEET3b*, *MtSWEET9b* и MtSWEET*13* значительно повышается, в то время как экспрессия MtSWEET1a, MtSWEET3c, MtSWEET15c, значительно падает [5].

Многие аспекты структуры, локализации, функций и филогении транспортеров семейства SWEET до сих пор неизвестны и их изучение является весьма актуальным в связи с выявленной значимостью этих унипортеров для функционирования как растений, так и растительно-микробных систем.

Целью исследования является оценка уровней экспрессии нескольких генов SWEET транспортеров у *M. lupulina*, уровней симбиотической эффективности при развитии арбускулярной микоризы, формируемой *M. lupulina* с *R. irregularis*.

Материалы и методы. Люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L. subsp. vulgaris Koch), а именно селектированная линия MlS-1.Растения этой линии проявляют признаки карликовости в отсутствии инокуляции АМ-грибом и низком уровне доступного фосфора в почве. Для инокуляции использован эффективный штамм RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis* (ранее известный как *Glomus intraradices* Shenck&Smith; шт. CIAM8 из коллекции института – ВНИИСХМ). Исследование проводили используя вегетативный и метод оценки параметров микоризации, РНК из растительного материала выделена с применением Тризольного метода. Синтез кДНК проведен с использованием набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase в соответствии с протоколом производителя набора (Thermo Scientific). Изменения экспрессии генов оценены с помощью метода количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением Термоциклера реального времени BioRad CFX-96 (BioRad, USA) и использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I. Параметры циклов амплификации, следующие: 95 °C, 10 мин, 1 цикл; 95 °C, 15 сек, 60 °C, 30 сек, 72 °C, 30 сек, 40 циклов. Оценка специфичности амплификации

проведена с использованием анализов кривой плавления. Изменения уровня экспрессии гена интереса в опыте сравнивалась с уровнем экспрессии данного гена в контроле, анализ проведен с помощью $2^{-\Delta CT}$ метода. Уровни генной экспрессии нормализованы с помощью выбранного, в результате ранее проведенного исследования, референсного гена – актина [6].

Для анализа экспрессии в листьях растений *M. lupulina*, инокулированных и неинокулированных АМ-грибом *R. irregularis*, отобраны следующие 10 генов: *MlSWEET1a*, *MlSWEET1b*, *MlSWEET2c*, *MlSWEET7*, *MlSWEET11*, *MlSWEET12*, *MlSWEET13*, *MlSWEET14*, *MlSWEET15c*, *MlSWEET16*.

Анализ экспрессии генов позволяет заключить, что генами, обладающими более высокой экспрессией в листьях микоризованных растений, являются: ***MlSWEET1a*** и ***MlSWEET1b***, при этом они обладают невысокой (6–8 из 10 анализируемых) экспрессией относительно референс гена – актина.

Полученные результаты обладают оригинальностью в подходе к изучению механизмов, контролирующих развитие эффективной АМ. Ранее не было показано исследований на специально селектированных линиях растений со сверхвысоким откликом на инокуляцию АМ-грибом.

Оригинальным является подход к отбору эффективных праймеров на гены интереса семейства SWEET с использованием результатов анализа транскриптома растений линии MlS-1 *M. lupulina.*

*Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, а также РФФИ №20-016-00245.*

## Литература

1. *Юрков А.П., Крюков А.А., Горбунова А.О., и др.* (2019) Молекулярно-генетические механизмы транспорта сахаров у растений в отсутствие и при развитии арбускулярной микоризы – Экологическая генетика. – 17 (1): 81–99.
2. *Chen, L.-Q., Hou, B. H., Lalonde, S., et al.* (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. – *Nature.* – 468: 527–532.
3. *Manck-Götzenberger J., Requena N.* (2016) Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. – Frontiers in Plant Science, 7: 487.
4. *Chandran D.* (2015) Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. – IUBMB Life. – 67(7):461–471.
5. *Hu B., Wu H., Huang W., et al.* (2019). SWEET Gene Family in Medicago truncatula: Genome-Wide Identification, Expression and Substrate Specificity Analysis. – Plants. – 8(9): 338.
6. *Yurkov A., Kryukov A., Gorbunova A., et al.* (2020) AM-Induced Alteration in the expression of genes, encoding phosphorus transporters and enzymes of carbohydrate metabolism in Medicago lupulina. – Plants. – 9: 486.

# Сравнение кинетических параметров РНКазы H фага T4 дикого типа и её DAS-мутанта

*Кузницын Р.А.[1], Холод Н.С.[1], Марченков В.В.[2], Майоров С.Г.[1], Грановский И.Э.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), rafailkuzn@gmail.com
[2] ФГБУН Институт белка РАН, г. Пущино

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37969

РНКаза H бактериофага T4 относится к суперсемейству Flap-эндонуклеаз – структуроспецифических 5’-нуклеаз, которые присутствуют во всех доменах живого от вирусов до эукариот. Белковые структуры представителей этой группы обладают высокой степенью гомологии: сходную организацию имеют участки, отвечающие за распознавание ДНК-субстрата, его связывание и катализ, а также за взаимодействие с другими белками. FENs участвуют практически во всех процессах метаболизма нуклеиновых кислот: в ряде процессов репарации повреждений ДНК (репарация неспаренных оснований и эксцизионная репарация), способны разрешать различные аберрантные структуры, а также структуры ДНК, возникаю-

щие во время рекомбинации (например, структура Холлидея). Таким образом, Flap-эндонуклеазы играют важную роль в поддержании целостности и функциональности генома.

Основная функция РНКазы Н бактериофага Т4 заключается в удалении РНК-затравок из отстающей цепи при репликации ДНК. Как и другие члены этого суперсемейства, РНКаза Н фага Т4, помимо 5'-экзонуклеазной, также демонстрирует эндонуклеазную активность в отношении ДНК-субстратов с разветвленной структурой.

Ранее нами был охарактеризован Das13-мутант РНКазы Н бактериофага Т4, который содержит замены V43I и L242I. С ними связана способность фага Т4 выживать при наличии дефектов в комплексе нуклеазы gp46/47, которые приводят к прекращению репликации на поздней стадии инфекции и обычно летальны. Это явление получило название *das*-эффект (от англ. DNA arrest suppressor). Установлено, что замена V43I приводит к увеличению экзонуклеазной активности более чем в 6 раз, а L242I не влияет на активность фермента, но необходима для *das*-эффекта *in vivo*.

Чтобы ответить на вопрос, чем обусловлено повышение экзонуклеазной активности мутанта Das13, были проведены эксперименты по определению каталитического акта фермента, процессивности РНКазы Н дикого типа и её мутантной формы. Также оценивали влияние ионов $Mg^{2+}$ на стабилизацию комплекса «субстрат-фермент». Для этого нами были получены варианты исследуемых белков, дефектные по нуклеазной активности: они содержат замену D13N в каталитическом центре фермента.

Сравнительный анализ экзонуклеазной активности показал, что за один каталитический акт Das13-мутант, как и РНКаза Н дикого типа, отщепляет 2-3 нуклеотидных остатка субстрата. Методом изменения электрофоретической подвижности ДНК (EMSA) было показано, что РНКаза Н, как в присутствие, так и в отсутствие ионов $Mg^{2+}$, не образует стабильный фермент-субстратный комплекс. Также нами была предпринята попытка сравнить процессивность РНКазы Н дикого типа и Das-мутанта. Подход к определению процессивности подразумевает формирование комплекса фермента с флуоресцентно меченым ДНК-субстратом и последующий запуск реакции добавлением ионов $Mg^{2+}$ и избытка конкурентного немеченого субстрата. Затем продукты реакции разделяют в денатурирующем полиакриламидном геле и анализируют профиль гидролиза. Избыток немеченого субстрата предотвращает повторное расщепление флуоресцентно меченого субстрата после первого акта диссоциации фермента. В данных экспериментах нам не удалось установить процессивность исследуемых вариантов РНКазы Н, что, по всей видимости, обусловлено неспособностью формировать стабильный комплекс с субстратом.

Методом измерения анизотропии флуоресценции было установлено значение константы диссоциации (Kd) комплекса РНКазы Н с субстратом. Для каталитических мутантов РНКазы Н было показано, что в присутствии ионов $Mg^{2+}$ формируется более стабильный субстрат-ферментный комплекс. Тем не менее, значения Kd для РНКазы Н дикого типа и Das13-мутанта оказались сопоставимыми.

В данном исследовании нам не удалось выявить какие-либо свойства Das-мутанта РНКазы Н, объясняющие повышение его экзонуклеазной активности. Возможно, Das-мутации влияют на процессивность РНКазы Н, метод определения которой предстоит разработать в дальнейшем.

## Изменение регуляции биосинтеза полиаминов у высокоактивного штамма *Acremonium chrysogenum*, продуцента цефалоспорина С

*Кукушкина В.И.[1,2], Карпова Н.В.[2], Нураева Г.К.[2], Январев Д.В.[3], Хомутов М.А.[3], Жгун А.А.[2]*

[1] РХТУ им Д.И. Менделеева, г. Москва, kucku.vera2011@yandex.ru
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва
[3] Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37970

Бета-лактамный антибиотик цефалоспорин С (цефС) – исходная субстанция при промышленном получении антибиотиков цефалоспоринового класса 1–5 поколений. Цефалоспорины – важнейший класс антибиотиков, одни из наиболее безопасных антимикробных лекарственных препаратов. Эти соедине-

ния обладают широким спектром действия, способны воздействовать как на грамположительные, так и на некоторые грамотрицательные бактерии. В промышленности цефС получают в результате ферментации улучшенных штаммов мицелиального гриба *Acremonium chrysogenum*. Процесс улучшения грибных штаммов происходит в результате классических методов улучшения, после многораундовых случайных мутагенезов и скрининга, позволяющий в 100 и более раз, увеличить выход целевых вторичных метаболитов, являющихся фармацевтически-важными соединениями, такими как, антибиотики, статины, иммунодепрессанты [1]. При этом для многих полученных этим методом промышленных продуцентов достигнут некий технологический предел улучшения; дальнейшие воздействия не приводят к увеличению продукции. Ранее было показано, что добавление экзогенных полиаминов в процессе ферментации способно дополнительно увеличить продукцию целевых вторичных метаболитов у высокоактивных грибных продуцентов, достигших своего технологического предела улучшения, например, цефС у *A. chrysogenum* HY, пенициллина G у *Penicillium chrysogenum*, или ловастатина у *Aspergillus terreus* [1–4]. Полиамины широко распространены в природе: спермидин, спермин и путресцин были обнаружены в клетках животных, растений, бактерий. На примере биосинтеза ловастатина показана взаимосвязь между метаболизм полиаминов и биосинтезом вторичных метаболитов у мицелиальных грибов [5, 6]. Также известно, что при добавлении экзогенных полиаминов к клеткам грибов повышается экспрессия гена LaeA, S-аденозилметионин-зависимой метилазы гистонов, являющейся глобальным регулятором вторичного метаболизма грибов, и которая стимулирует транскрипцию генов биосинтеза бета-лактамов и статинов [3, 4, 7, 8].

Объектом нашего исследования был высокоактивный штамм *A. chrysogenum* HY (ВКМ F-4081D), у которого выход цефС увеличен более чем в 100 раз по сравнению с исходным штаммом дикого типа *A. chrysogenum* ATCC 11550 (WT). На первом этапе методом разведения капель в агаре показали, что в процессе случайного мутагенеза, примененного к штамму *A. chrysogenum* HY, не были затронуты основные пути усвоения азота. Для этого изучили морфологические особенности при росте *A. chrysogenum* HY по сравнению с *A. chrysogenum* WT на агаризованной среде Чапека с добавлением различных источников азота ($NaNO_3$, $NH_4CL$, мочевина, L-аспарагин и L-глутамин) в диапазоне концентраций 5–50 мМ. Эти результаты важны, поскольку для построения полиаминов требуется азот, в частности, исходным субстратом для биосинтеза полиаминов у мицеллиальных грибов служит L-аргинин.

Эти результаты, показывающие, что пути усвоения различных источников азота не изменены у высокоактивного продуцента цефС, позволили нам перейти к следующему этапу работы, связанному с изучением возможных изменений в непосредственно биосинтезе полиаминов. Существуют два основных пути получения из L-аргинина полиамина путресцина (исходного для биосинтеза последующих полиаминов более высокого молекулярного веса): через синтез L-орнитина, в результате работы аргиназы и орнитин-декарбоксилазой (ODC) или через получение агматина, в результате работы аргинин-декарбоксилазы (ADC) и агмантиназы. Методом ингибиторного анализа для HY штамма показали значительное повышение устойчивости к ингибиторам ODC, ключевого фермента биосинтеза путресцина. Это эффект продемонстрировали методом разведения капель в агаре на среде Чапека-Докса против двух ингибиторов этого фермента: α-дифторметилорнитина (ДФМО) и 1-аминоокси-3-аминопропана (АРА) в диапазоне концентраций, от 0.25 до 10 мМ. Токсический эффект снимался добавлением 5 мМ спермидина, но не α-метил-спермидином. Наряду с этим, штамм *A. chrysogenum* HY продемонстрировал повышенную чувствительность к ингибиторам ADC, фермента альтернативного пути биосинтеза путресцина. Вещества DL-α-дифторметиларгинин (ДФМА) и 1-аминоокси-3-гуанидинопропан (АО-Agm, аминоокси-агматин) ингибировали рост колоний штамма *A. chrysogenum* HY сильнее, чем *A. chrysogenum* WT.

Для того чтобы объяснить выявленный феномен у обоих штаммов определили содержание полиаминов в процессе культивирования. Оказалось, что у высокоактивного штамма на HY количество полиаминов увеличено в 4–5 раз. Это могло быть побочным явлением при получении этого штамма методами случайного мутагенеза, поскольку их повышенное содержание способствует как радиорезистентности, так и устойчивости к окислительным повреждениям, возникающим в процессе классического улучшения штамма [9–11].

Полученные результаты важны для дальнейшего изучения феномена повышения продукции целевых ВМ при экзогенном введении полиаминов, с дальнейшей целью направленного генно-инженерного воздействия для повышения продукции у высокоактивных грибных продуцентов.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173.*

## Литература

1. *Zhgun A.A.* Random Mutagenesis of Filamentous Fungi Stains for High-Yield Production of Secondary Metabolites: The Role of Polyamines. In Genotoxicity and Mutagenicity – Mechanisms and Test Methods, Chapter 2.; Soloneski, S., Larramendy, M.L., Eds.; IntechOpen, 2021; pp. 25–41 ISBN 978-1-83880-041-3.
2. *Zhgun A.A.; Kalinin S.G.; Novak M.I.; Domratcheva a G.; Petukhov D.V; Dzhavakhiya V.V; Eldarov M.A.; Bartoshevitch I.E.* The influence of polyamines on cephalosporine C biosynthesis in Acremonium chrysogenum strains. Izv Vuzov. Prikl Khim i Biotech. 2015, 14, 47–54.
3. *Martín J.; García-Estrada C.; Kosalková K.; Ullán R.V; Albillos S.M.; Martín J.-F.* The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the LaeA regulator. Fungal Genet. Biol. 2012, 49*,* 1004–13, doi:10.1016/j.fgb.2012.10.001.
4. *Zhgun A.A.; Nuraeva G.K.; Dumina M.V.; Voinova T.M.; Dzhavakhiya V.V.; Eldarov M.A.* 1,3-Diaminopropane and Spermidine Upregulate Lovastatin Production and Expression of Lovastatin Biosynthetic Genes in Aspergillus terreus via LaeA Regulation. Appl. Biochem. Microbiol. 2019, 55, 243–254, doi:10.1134/S0003683819020170.
5. *Zhgun A.A.; Nuraeva G.K.; Eldarov M.A.* The Role of LaeA and LovE Regulators in Lovastatin Biosynthesis with Exogenous Polyamines in Aspergillus terreus. Appl. Biochem. Microbiol. 2019, 55, doi:10.1134/S0003683819060176.
6. *Barrios-González J.; Pérez-Sánchez A.; Bibián M.E.* New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of Aspergillus terreus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020, 1–20, doi:10.1007/s00253-020-10871-x.
7. *Sarikaya-Bayram Ö.; Palmer J.M.; Keller N.; Braus G.H.; Bayram, Ö.* One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. Front. Microbiol. 2015, 6, 1, doi:10.3389/fmicb.2015.00001.
8. *Palonen E.K.; Raina S.; Brandt A.; Meriluoto J.; Keshavarz T.; Soini J.T.* Transcriptomic Complexity of Aspergillus terreus Velvet Gene Family under the Influence of Butyrolactone I. Microorganisms 2017, 5, doi:10.3390/microorganisms5010012.
9. *Lee C.-Y.; Su G.-C.; Huang W.-Y.; Ko M.-Y.; Yeh H.-Y.; Chang G.-D.; Lin S.-J.; Chi P.* Promotion of homology-directed DNA repair by polyamines. Nat. Commun. 2019, 10, 65, doi:10.1038/s41467-018-08011-1.
10. *Murray Stewart T.; Dunston T.T.; Woster P.M.; Casero R.A.* Polyamine catabolism and oxidative damage. J. Biol. Chem. 2018, 293, 18736–18745, doi:10.1074/jbc.TM118.003337.
11. *Ha H.C.; Sirisoma N.S.; Kuppusamy P.; Zweier J.L.; Woster, P.M.; Casero, R.A.* The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998, 9*5*, 11140–11145, doi:10.1073/pnas.95.19.11140.


# ДНК-связывающие белки системы арбитриум бактериофага vB_BtS_B83


*Кулябин В.А., Шадрин А.М.*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, unicorn.vlad@gmail.com



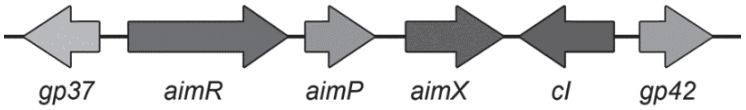
DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37971


Бактериофаги, заражающие прокариот рода *Bacillus*, используют пептидную коммуникационную систему, называемую *арбитриум*, для координации принятия решения выбора литического или лизогенного пути развития. Во время литической инфекции, каждая зараженная бактериофагом клетка производит определенное количество коммуникационного пептида (AimP), который высвобождается во внешнюю среду и проникает в соседние бактерии. При последующих инфекциях фаги заражают клетки-хозяева, которые уже содержат определенную концентрацию пептида AimP. Наличие такого пептида приводит к предпочтению выбора лизогенного пути развития. Такая коммуникация позволяет инфицирующему фагу оценить плотность бактериальной популяции и переключиться на лизогенный цикл, когда её значительная часть уже заражена и последующие заражения будут непродуктивны или невозможны. Управление экспрессии генов регулируется «системой арбитриум», которая включает в себя гены: *aimR*,

*aimP*, *aimX* и *cI* [2]. Однако детали механизмов индукции бактериофагов, опосредованных этой системой в настоящее время мало изучены.

Целью работы является изучение ДНК-связывающей активности белков системы арбитриум. В качестве модельного объекта был выбран бактериофаг B83 (vB_BtS_B83) – хвостатый фаг, индуцированный митомицином С из штамма *B. thuringiensis* VKM B-83. Особенностью фага B83 является то, что в лизогенном состоянии он реплицируется в виде плазмиды [1]. Мы расширили систему арбитриум бактериофага B83, так как существенно важными генами этой системы являются *aimR* и *cI*, которые в свою очередь имеют дивергентно-направленные, соседние гены *gp37* и *gp42* соответственно (рис. 1), поскольку известны случаи, когда транскрипция с дивергентных промоторов оказывала влияние на экспрессию генов.

**Рис. 1.** Архитектура системы арбитриум бактериофага B83




Интересующие гены (*gp37, aimR, cI, gp42*) бактериофага B83 были клонированы в плазмиду pET33; рекомбинантные белки экспрессировались в системе *E. coli* BL21(DE3) pET33 и были очищены с помощью металл-хелатной хроматографии. Моделирование структуры белков проводилось с использованием веб-приложения I-TASSER, которое идентифицирует структурные шаблоны из PDB с помощью многопоточного подхода LOMETS. Активность белков проверялась модифицированным методом сдвига электрофоретической подвижности в 5% полиакриламидном геле. Расчёт констант диссоциации производился в программном обеспечении GraphPad Prism.

Сравнение 3D моделей белков системы арбитриум с белками, депонированными в PDB, показало, что структура AimR фага B83 полностью соответствует белку AimR бактериофага phi3T, заражающего *B. subtilis*. Предсказанная модель белка Gp37 структурно аналогична N-концевому домену SinR *B. subtilis*, который действует как репрессор ключевого гена спорообразования *spo0A* и участвует в формировании биопленки. Выравнивание модели белка Gp42 выявило схожесть с C2 репрессорным белком бактериофага *Salmonella virus* P22, ответственным за лизогенное состояние. Хотя для CI белка фага B83 и не нашлось полных структурных аналогов, он показал некоторую структурную схожесть с различными транскрипционными факторами и ДНК-связывающими белками.

Была оценена ДНК-связывающая способность выделенных белков в пределах системы арбитриум. Из литературных данных известно, что белок AimR функционирует в виде димера и взаимодействует с областью ДНК перед геном *aimX* (gp_39_40). Белок AimR фага B83 связывал участок ДНК фага B83 перед геном *aimX* (рис. 2А), кроме того, AimR показал ДНК-связывающую активность с участком ДНК, содержащую собственную промоторную область. Для димерной формы AimR были рассчитаны константы диссоциации, значения которых составили Kd(gp_39_40) = 12.07±0.99 нМ для промотора *aimX* и Kd(gp_37_38) = 60.64±7.9 нМ, для промотора *aimR* (рис. 2Б). Таким образом, Kd для участка ДНК с собственным промотором *aimR* в 5 раз меньше чем перед промотором *aimX*, что указывает на то что в первую очередь активируется промотор *aimX*, а уже потом происходит автоактивация промотора *aimR*.

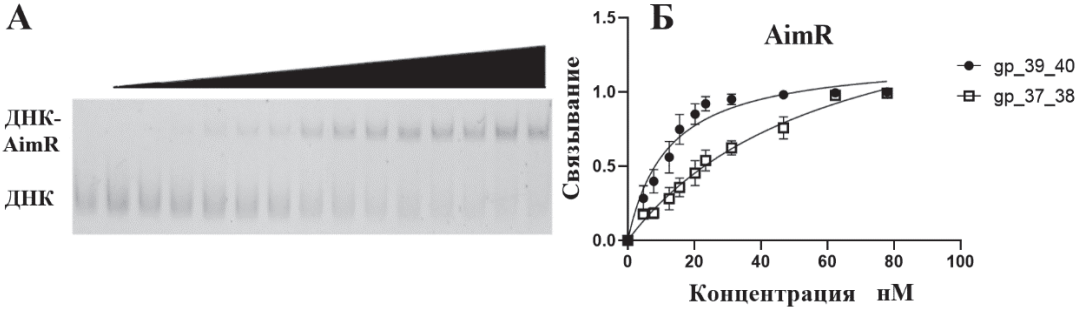



**Рис. 2.** А. Фотография 5% PAGE. Связывание белка AimR с ДНК фрагментом gp39_40 с увеличением концентрации белка. Б. График зависимости концентрации белка AimR от доли связывания с ДНК фрагментами gp_39_40 и gp_37_38

Белок Gp37 продемонстрировал ДНК-связывающую активность с участком gp_37_38, содержащий промотор *aimR*, и, вероятно, активен в качестве олигомера. В свою очередь, белки Gp42 и CI не показали способность связываться с участками ДНК в пределах системы арбитриум.

Полученные данные в ходе этой работы результаты помогут глубже понять механизмы переключения лизис-лизогении бактериофагов и дополнить картину внутреннего взаимодействия транскрипционных факторов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300*

## Литература

1. «Bacillus Phage vB_BtS_B83 Previously Designated as a Plasmid May Represent a New Siphoviridae Genus» Emma G. Piligrimova et al. Viruses 2019, 11, 624.
2. «Widespread Utilization of Peptide Communication in Phages Infecting Soil and Pathogenic Bacteria» Stokar-Avihail et al., 2019, Cell Host & Microbe 25, 746–755, May 8, 2019.

# Роль лакказы зигомицетного гриба *Mortierella elasson* ВКМ F-1406 в деградации гуминовых кислот

*Лисов А.В.[1], Белова О.В.[1], Заварзина А.Г.[2], Константинов А.И.[2], Леонтьевский А.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
ssl208@rambler.ru
[2] Московский государственный университет

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37972

Почвы содержат около 1500 Гт органического углерода в одном метровом слое. Стабильность и устойчивость этого огромного пула органических веществ зависит от химической структуры соединений, биоклиматических условий микробной активности почвы. Гуминовые кислоты (ГК – щелочнорастворимые, нерастворимые в кислоте компоненты гумуса) служат характерной и количественно значимой рабочей фракцией гумуса, составляющей 10–40% Сорг в гумусовых горизонтах. Эта фракция в основном представлена полярными гидрофильными соединениями, содержащими карбоксильные и фенольные фрагменты. В минеральных почвенных горизонтах большая часть этих гуминовых компонентов стабилизируется за счет взаимодействия с минеральной матрицей почвы. Преобразование и разложение органических остатков и гуминовых веществ в значительной степени является окислительным процессом, ключевую роль в котором играют грибы.

Биохимическая стабилизация почвенного гумуса является важным фактором, влияющим на качество почвы. Грибы являются одними из самых эффективных организмов, разрушающих гуминовые вещества. Разложение гуминовых веществ грибы осуществляют за счёт окислительных ферментов, в том числе фенолоксидазы – лакказы. Продукция лакказы зигомицетами – широко распространенной в почве группой целлюлолитических грибов – мало изучена. Потенциальная роль лакказы зигомицетов в трансформации гумуса неизвестна. Здесь мы впервые показываем, что лакказа зигомицетного гриба *Mortierella elasson* может эффективно деполимеризовать ГК *in vitro*. Гриб продуцировал лакказу внеклеточно в жидкой культуральной среде. В отличие от лакказ лигнинолитических базидиомицетов, попытки увеличить активность фермента с помощью индукторов, изменения источника азота и углерода в среде культивирования не привели к какому-либо увеличению продукции лакказы. Лакказу очищали с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Молекулярная масса лакказы составляла 51,75 кДа. Лакказа гриба *M. elasson* катализировала окисление ABTS и $K_4[Fe(CN)_6]$, фенольных соединений, но не тирозина. Активность лакказы подавлялась $NaN_3$ и NaF. Оптимум pH активности лакказы

составлял 3,0 для ABTS и 5,0 для 2,6-диметоксифенола. Фермент имел умеренную термостабильность и в течение нескольких минут инактивировался при 70 °С. Очищенная лакказа деполимеризовала гуминовые кислоты из подзолистой почвы, компоста и торфа более эффективно, чем культуральная жидкость гриба, содержащая лакказу. Результаты исследования расширяют наши знания о роли лакказ различных продуцентов в трансформации природного органического вещества.

## Секвенирование и анализ генома бактерии *Vibrio* sp. CB2-10, выделенной из морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*

*Личманюк Д.О.[1], Отставных Н.Ю.[2], Куриленко В.В.[2], Исаева М.П.[2]*

[1] Дальневосточный федеральный университет, Владивосток
[2] Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток,
lichmanyukdarina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37973

На сегодняшний день род *Vibrio* является одной из самых многочисленных групп бактерий, представленной 133 видами. Также это одна из доминирующих групп морской среды и морских микробных сообществ, в которой 12 видов патогенны для человека. Недавно из слизи (мукуса) ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus* (тип Annelida) были выделены морские бактерии рода *Vibrio*, среди которых *Vibrio* sp. CB1-14 был определен как продуцент 6-эпи-монанхорина и возможный кандидат на новый вид рода *Vibrio* (1). Ранее исследование экстрактов этой полихеты привели к неожиданному открытию бициклических гуанидиновых алкалоидов, монанхорина и 6-эпи-монанхорина, которые также были обнаружены у морских губок *Monanchora unguiculata* и *Halichondria panicea* (2).

Целью настоящего исследования являлась характеристика штамма резервного фонда Коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН – *Vibrio* sp. CB2-10, изолированного из мукуса *Ch. variopedatus*, который предположительно относится к новому виду *Vibrio*, как и штамм CB1-14. Черновой геном штамма CB2-10 был получен с использованием высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США) и набора реагентов Nextera DNA Flex kits (Illumina, USA). Сборка прочтений *de novo* осуществлена в контиги с помощью SPAdes 3.15.3, аннотация полученного генома была выполнена на сервере RAST. Геном CB2-10 был собран в 107 контигов с N50 равным 178128 п.н., размер генома был оценен в 5496794 п.н. (полнота 99.09%, контаминация 1.9%) и 46.04% ГЦ-состава. Показатель ANIb между штаммами CB2-10 и CB1-14 составил 99.62%, а типовыми штаммами *Vibrio maritimus* CAIM 1455$^T$ и *Vibrio variabilis* CAIM 1454$^T$ 91.06% и 90.11%, соответственно. Филогеномный анализ, выполненный для 25 типовых штаммов рода *Vibrio*, показал, что штаммы *Vibrio* sp. CB1-14 и CB2-10 могут быть представителями нового вида рода *Vibrio*.

*Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).*

### Литература

1. *Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., Isaeva M., Chernysheva N., Popov R., Bystritskaya E., Dmitrenok P., Stonik V.* 2019. Marine drugs 17(4):213. DOI:10.3390/md17040213.
2. *Shubina L.K., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Glazunov V.P., Silchenko A.S., Stonik I.V., Lee H.S., Lee Y.J., Stonik V.A.* 2016 Natural product communications. 11(9). DOI:10.1177/1934578X1601100915.

# Укороченный с N-конца природный вариант HlyII *B. cereus* обеспечивает адгезию эритроцитов

*Лучкина П.Н.[1,3], Нагель А.С.[1], Андреева-Ковалевская Ж.И.[1], Сиунов А.В.[1], Замятина А.В.[2], Каратовская А.П.[2], Руденко Н.В.[2,3], Солонин А.С.[1,3]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, г. Пущино, solonin.a.s@yandex.ru
[3] ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт», г. Пущино

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37974

Микроорганизмы группы *Bacillus cereus* sensu lato продуцируют ряд экзотоксинов, способных вызывать различные заболевания у макроорганизмов. Один из цитолитических порообразующих токсинов *Bacillus cereus* – гемолизин II (HlyII) представляет особый интерес, так как он широко распространен среди бацилл цереусной группы.[1] Однако известно, что не все штаммы группы *B. cereus* могут синтезировать гемолизин II. Например, во всех описанных к настоящему времени штаммах *Bacillus anthracis* ген гемолизина II имеет мутацию сдвига рамки и потому не функционирует [2]. А в некоторых штаммах *Bacillus thuringiensis* структура гена гемолизина II нарушена [3], в во втором случае может образоваться полипептид, который имеет в своем составе только часть, потенциально кодирующую С-терминальный участок гемолизина II M225-I412 (нумерация аминокислот относительно HlyII из *Bacillus cereus* ATCC14579) – названный нами HlyIILCTD.

HlyIILCTD теоретически может синтезироваться в качестве отдельного полипептида и быть значимой функциональной единицей так как присутствует участок, включающий последовательности нуклеотидов, подобный сайту связывания с рибосомой перед структурной частью участка гена hlyII [4]. Ранее обнаруженный нами с помощью моноклональных антител против HlyIICTD [5] один из белковых продуктов по размеру соответствует расчетной длине полипептида в рекомбинантном штамме *B. subtilis* BD170, содержащем интегративную плазмиду с регуляторной и структурной последовательностью гена *hlyII* VKM-B771. Непосредственно перед аминокислотной последовательностью HlyIILCTD обнаружена короткая аминокислотная последовательность включающая Tyr_Gly_Asn_Gln_Leu_Phe_Met. Идентичная аминокислотная последовательность обнаружена перед гипотетическими рамками считывания у многих бактериальных β-складчатых порообразующих. Возможно эта последовательность является существенной для формирования укороченных последовательностей у части бактериальных β-складчатых порообразующих токсинов Все перечисленные белки входят в одно семейство порообразующих токсинов хотя лишены удлиненного участка HlyIICTD, характерного для HlyII..

Для изучения функции HlyIILCTD участок гена *hlyII Bacillus cereus* ATCC 14579, кодирующий M225-I412 был клонирован в *E. coli* с помощью вектора pET19mod по сайтам NdeI и XhoI таким образом, чтобы конечный продукт имел на N-конце гексагистидиновый участок и сайт для TEV протеазы. Для увеличенной экспрессии HlyIILCTD, полученная рекомбинантная плазмида pET19mod:HlyIILCTD14579 была введена в *E. coli* BL21(DE3). Большая часть полученного в *E. coli* целевого белка находилась в клеточном дебрисе в агрегированном состоянии, в связи с этим дальнейшую очистку проводили на Ni-NTA (QiaGEN) в денатурирующих условиях в присутствии 6M мочевины с последующим рефолдингом. Выделенный и очищенный HlyIILCTD был проверен на наличие гемолитической активности на эритроцитах кролика [6]. Значимого лизиса эритроцитов не выявлено, но в процессе протекания реакции была обнаружена агрегация эритроцитов в растворе с дальнейшим их налипанием на стенки полипропиленовой пробирки. Степень и скорость агрегации прямо пропорционально зависела от количества добавленного в реакцию HlyIILCTD. С помощью световой микроскопии наблюдаемый эффект был подтвержден и на эритроцитах человека.

Из полученных данных можно предположить, что HlyIILCTD является самостоятельной функционально-значимой единицей независимо от того, является ли он продуктом экспрессии с инициирующе-

го кодона внутри последовательности *hlyII* или продуктом специфического протеолиза гемолизина II. HlyIILCTD облададает ярко-выраженной адгезивной активностью, приводящей к агрегации эритроцитов. В роли домена гемолизина II HlyIILCTD, таким образом, может способствовать связыванию токсина с поверхностью эукариотических клеток. В роли самостоятельного продукта HlyIILCTD может участвовать в развитии патологических процессов связанных с агрегацией эритроцитов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592*

## Литература

1. *Baida G. et al.* Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 180, № 1. P. 7–14.
2. *Ravel J. et al.* The complete genome sequence of Bacillus anthracis Ames “Ancestor” // J Bacteriol. 2009. Vol. 191, № 1. P. 445–446.
3. *Moumen B., Nguen-The C., Sorokin A.* Sequence Analysis of Inducible Prophage phIS3501 Integrated into the Haemolysin II Gene of Bacillus thuringiensis var israelensis ATCC35646 // Genet Res Int. 2012. Vol. 2012. P. 543286.
4. *Rudenko N.V. et al.* C-Terminal Domain of Bacillus cereus Hemolysin II Is Able to Interact with Erythrocytes // Russ J Bioorg Chem. 2020. Vol. 46, № 3. P. 321–326.
5. *Shine J., Dalgarno L.* 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature 254:34–38. http://dx.doi.org/10.1038/254034a05.
6. A*ndreeva Z.I. et al.* Purification and cytotoxic properties of Bacillus cereus hemolysin II // Protein Expr. Purif. 2006. Vol. 47, № 1. P. 186–193.

# Деградация углеводородов штаммом *Pseudomonas veronii* 7-41 в моно- и бисубстратных системах

*Мулаева С.А.[1], Иванова А.А.[1], Сазонова О.И.[1], Петриков К.В.[1], Делеган Я.А.[1], Стрелецкий Р.А.[2], Ветрова А.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
sv.mullaeva@icloud.com
[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37975

Одним из наиболее часто используемых методов ликвидации нефтяных загрязнений является применение биопрепаратов на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов. К наиболее изучаемым объектам в исследованиях, связанных с биодеградацией нефти и нефтепродуктов, относятся бактерии рода *Pseudomonas*. Псевдомонады являются повсеместно распространенными микроорганизмами, у которых часто встречается способность к окислению разнообразных поллютантов, в том числе, и углеводородов нефти. На сегодняшний момент подробно изучены отдельные биохимические пути деградации углеводородов и организация соответствующих генетических детерминант. Практически весь этот объём информации получен для бактерий-деструкторов или индивидуальных углеводородов, или модельного набора нескольких веществ одного класса, в то же время малоизученными остаются микроорганизмы, обладающие способностью окислять субстраты различных классов. В рамках изучения биодеградации особый интерес представляет микроорганизмов, обладающих мультидеградативными способностями. Очевидно, что механизмы, обеспечивающие бактериям конкурентное преимущество за счёт возможности к росту на разных субстратах, являются важными элементами микробного метаболизма. Большинство работ по изучению микроорганизмов, способных к одновременной деградации алифатических и ароматических углеводородов, было посвящено фенотипическим и частично генетическим исследованиям. Цель данной работы – определение генетических аспектов систем биодеградации углеводоро-

дов и изучение физиолого-биохимических особенностей штамма *Pseudomonas veronii* 7-41, утилизирующего ароматические и алифатические соединения в моно- и бисубстратных системах.

Собран и проаннотирован геном штамма *Pseudomonas veronii* 7-41. В исследуемом штамме присутствуют полностью функциональные генетические системы, отвечающие за деградацию алканов и ПАУ, причем их организация не отличается от таковой у узкоспециализированных деструкторов отдельных классов субстратов.

В бисубстратной системе штамм сначала потребляет алифатические соединения, а деградация нафталина происходит, когда концентрация декана в среде снижается до критического уровня за счет его большой абиотической убыли. При этом у штамма 7-41 наблюдается снижение численности и деградации субстратов, что может быть обусловлено влиянием декана или продуктов его метаболизма на ферментные системы деградации катехола, как по *мета*-, так и по *орто*-пути. В моно- и бисубстратной системах было продемонстрировано, что рост штамма на декане сопровождается падением активности катехол-2,3-диоксигеназы. Вероятно, существует механизм репрессии этого фермента, в котором декан выступает регулятором.

В дальнейшем для выявления закономерностей взаимодействия нескольких систем метаболизма в зависимости от условий роста будут использованы транскриптомный и протеомный подходы, позволяющие получить комплексную оценку изменений экспрессии сразу сотен генов и белков.

## Оптимизация технологии получения рекомбинантного аннексина V, меченного FITC, для количественной детекции апоптоза в клетках эукариот

*Новикова Н.И.[1], Калинин Д.С.[2], Майоров С.Г.[2], Валиахметов А.Я.[2], Грановский И.Э.[2], Земскова М.Ю.[2]*

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
nataliya.novikova2000@mail.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37976

Аннексин V – $Ca^{2+}$-зависимый фосфолипид-связывающий белок, обладающий высоким сродством к фосфатидилсерину, широко представленному в поверхностном слое мембраны апоптотических клеток. Конъюгация аннексина V с флюорохромами делает данное вещество оптимальным маркером для количественной детекции программируемой клеточной гибели путем апоптоза в клетках эукариот.

Целью нашей работы стала оптимизация технологии получения аннексина V, меченного FITC.

Ген аннексина V человека, hANXA5, был синтезирован искусственно и клонирован в экспрессионный вектор pET-28a под контроль промотора фага T7. Структура гена была оптимизирована для экспрессии в клетках кишечной палочки. По результатам работы был создан штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3)/pANXA5-28a, в котором в условиях индукции наблюдалась высокоэффективная продукция целевого белка. Анализ экспрессии показал, что исследуемый белок находится преимущественно в растворимой форме. Были подобраны условия, позволяющие получать препарат аннексина V чистотой более 95% с использованием метал-хелатной смолы. Полученный препарат белка был конъюгирован с FITC, и меченый белок был очищен на анионообменном сорбенте (рис. 1).

Эффективность использования полученного препарата FITC-меченого аннексина V для детекции клеточной гибели в культуре клеток эукариот была оценена на клеточных линиях рака простаты (PC3, LNCap), рака молочной железы (MCF 7, MDAMB 231), клетках селезенки свиньи (SSS) и клеточной линии первичных моноцитов, выделенных из периферической крови свиньи. Индукция программируемой клеточной гибели путем апоптоза была проведена посредством обработки клеток стауроспорином, который является ингибитором ряда клеточных киназ. В качестве отрицательного контроля использо-

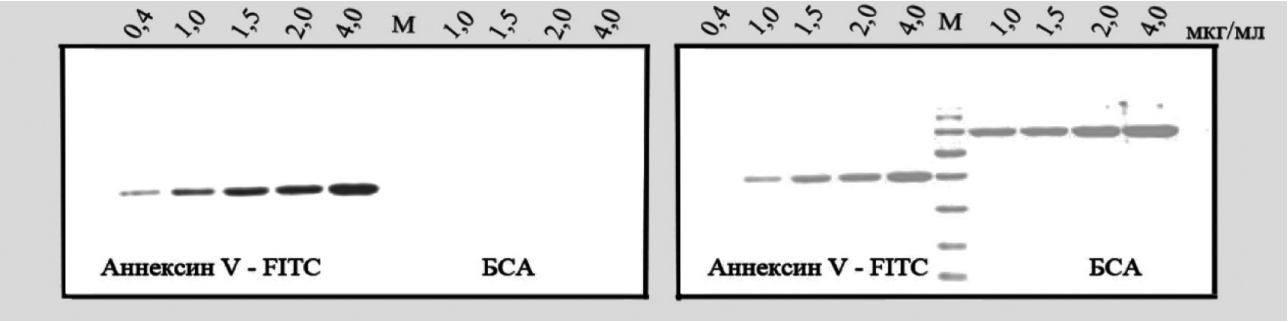



**Рис. 1.** Анализ ПАА геля после SDS-PAGE А) Флуоресценция аннексина V (35 кДа), конъюгированного с FITC. Анализ с помощью программного обеспечения Typhoon. Б) Окрашивание Coomasie. БСА используется в качестве контроля нанесения ряда концентраций аннексина V – FITC

вались образцы клеток, обработанные эквимолярным раствором DMSO. Анализ проб клеточной суспензии, инкубированных с реагентом аннексин V – FITC в диапазоне концентраций 0,4–20 мкг/мл, был проведен посредством проточной цитометрии. Оптимальная концентрация FITC-меченого аннексина V составила 2 мкг/мл.

В результате была разработана высокопроизводительная методика получения реагента аннексин V – FITC с выходом 280 мг белка с одного литра бактериальной культуры. Стоимость доступных коммерческих наборов неоправданно высока, что зачастую является лимитирующим фактором для проведения анализа клеточной гибели. Разработанная в данной работе методика получения аннексина V может позволить повысить доступность для проведения исследований в науке и медицине.

## Молекулярно-генетическая характеристика бактерий рода *Zobellia*: молекулярное типирование и геномный анализ

*Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Михайлов В.В., Исаева М.П.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток,
chernysheva.nadezhda@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37977

Род *Zobellia* впервые был описан Barbeyron и др. (1) как член сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidetes*, который объединил грамотрицательные, подвижные и палочковидные бактерии, образующие оранжевые или желтые колонии и продуцирующие пигменты флексирубинового типа. Типовой штамм типового вида рода *Zobellia galactanovorans* Dsij$^T$ получил широкую известность в качестве бактерии, специализирующейся на деградации полисахаридов, и поэтому был предложен в качестве модельного организма для изучения взаимодействия бактерий и водорослей (2).

В настоящее время род *Zobellia* включает семь валидно описанных видов, которые были выделены из красных, бурых и зеленых водорослей, морской воды, а также поверхностных отложений. Нами были получены геномы трех типовых штаммов видов *Z. amurskyensis* KMM 3526$^T$, *Z. laminariae* KMM 3676$^T$ и *Z. russellii* KMM 3677$^T$. Сравнительный геномный анализ показал, что богатый гидролитический потенциал бактерий сохраняется на уровне рода, а доля генов, кодирующих углеводно-активные ферменты (CAZymes), достигает более 6% от общего количества предсказанных белок-кодирующих генов (3, 4).

Нами описан и охарактеризован новый вид '*Z. barbeyronii*' KMM 6746$^T$ (= 36-CHABK-3-33$^T$ = KACC 21790$^T$). На основе генома типового штамма были разработаны праймеры для мультилокусного типирования последовательностей фрагментов 5 консервативных генов «домашнего хозяйства», *dnaK*, *gyrB*, *pyrH*,

*recA* и *topA*, для изучения межштаммовых различий среди пяти изолятов данного вида – 36-CHABK-3-51, 36-CHABK-3-57, 36-CHABK-3-61, 36-RHABK-5-24, 36-RHABK-5-54 (5).

В Коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН содержится 46 штаммов, отнесенных к роду *Zobellia*, среди которых могут находиться кандидаты на новые виды. Нами были разработаны вырожденные праймеры, с учетом 15 доступных геномов *Zobellia*, для генетического типирования шести генов «домашнего хозяйства» – *dnaK*, *gyrB*, *pyrH*, *recA*, *topA* и *trpB*. Данные молекулярного типирования штаммов позволили получить представление о генетическом разнообразии микроорганизмов рода *Zobellia*. В дальнейшем молекулярное типирование позволит проводить генетический скрининг коллекционных штаммов.

*Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).*

## Литература

1. *Barbeyron T., l'Haridon S., Corre E., Kloareg B., Potin P.* 2001. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:985–997. DOI:10.1099/00207713-51-3-985
2. *Barbeyron T., Thomas F., Barbe V., Teeling H., Schenowitz C., Dossat C., Goesmann A., Leblanc C., Glöckner F.O., Czjzek M., et al.* 2016. Environ. Microbiol. 18:4610–4627. DOI:10.1111/1462-2920.13584.
3. *Chernysheva N., Bystritskaya E., Stenkova A., Golovkin I., Nedashkovskaya O., Isaeva M.* 2019. Mar. Drugs 17:661. DOI:10.3390/md17120661.
4. *Chernysheva N., Bystritskaya E., Likhatskaya G., Nedashkovskaya O., Isaeva M.* 2021. Molecules 26:2387. DOI:10.3390/molecules26082387.
5. *Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., Zhukova N., Guzev K., Chausova V., Tekutyeva L., Isaeva M.* 2021. Diversity 13(11):520. DOI: 10.3390/d13110520.

# Механизмы адаптации представителей рода *Acinetobacter*

*Петрова М.А., Миндлин С.З.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», petrova@img.ras.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37978

Штаммы *Acinetobacter* (*A.*) представляют особый интерес в связи с огромным разнообразием мест их обитания и множеством обнаруженных у них метаболических способностей. Штаммы *A.* повсеместно встречаются в почвах, ризосфере растений и на их поверхности. Многие виды живут в окружающей среде и одновременно являются комменсалами и/или патогенами человека, животных и насекомых. Также среди *A.* имеются способные к эффективной деградации углеводородов штаммы, живущие в местах разлива нефти. Наиболее изученным видом *A.* является патоген человека *A. baumannii* – возбудитель внутрибольничных инфекций, штаммы которого чаще всего обладают исключительно широкой множественной лекарственной устойчивостью. В последние годы, благодаря развитию и широкому применению технологий NGS, получены данные, проливающие свет на механизмы, обеспечивающие удивительную пластичность штаммов *A.* Оказалось, что подавляющее большинство штаммов *A.* содержат многочисленные как мелкие, так и крупные плазмиды. В частности, были обнаружены конъюгативные мега-плазмиды, обеспечивающие активный горизонтальный перенос одновременно большого количества адаптивных генов.

Сравнение древних природных плазмид, обнаруженных в штаммах *A. lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений, с современными плазмидами позволило ясно проследить процессы адаптации и показало, что плазмиды служат основной платформой для постоянного обмена генетическим материалом, хотя степень участия плазмид в приобретении адаптационных генов у штаммов *A.* разных

видов может быть разной. Приобретение плазмидами новых генов и утрата участков, потерявших свое значение в приспособленности к новой среде обитания, происходит при активном участии различных мобильных элементов (IS-элементов, траспозонов, интегронов, умеренных бактериофагов), а также различных систем рекомбинации.

Кроме того, в ходе эволюции у штаммов рода *A.* возникли собственные уникальные механизмы горизонтального переноса плазмидных генов. Например, у представителей рода *A.* в горизонтальном переносе различных дополнительных плазмидных генов активно задействована клеточная система сайт-специфической рекомбинации XerC/XerD, за счет формирования особого типа мобильных генетических элементов фланкированных *dif*-подобными сайтами.

Таким образом, у штаммов *A.* на плазмидах происходит сборка новых комбинаций генов, необходимых для приспособления к условиям среды. Для клинических штаммов – это преимущественно гены устойчивости к различным антибиотикам, а для природных – опероны устойчивости к различным тяжелым металлам и другим стрессовым факторам окружающей среды. Сами плазмиды способствуют быстрому распространению среди штаммов *A.* тех генов, которые необходимы для успешного выживания в конкретных условиях.

Таким образом, пластичность и биологический прогресс представителей рода *A.* тесно связаны с постоянным активным горизонтальным переносом плазмидных генов.

## Флуоресцентная микроскопия микроорганизмов, сопряженная с компьютерной обработкой и анализом изображений

*Пучков Е.О.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина АН),
puchkov@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37979

За последние двадцать лет флуоресцентная микроскопия трансформировалась из *субъективного визуального* метода в *объективный аналитический* подход. Произошло это, прежде всего, благодаря разработке и внедрению методов компьютерной обработки и анализа цифровых изображений.

Принципы компьютерной обработки и анализа цифровых изображений в приложении к микроскопии достаточно подробно изложены во многих публикациях, в частности, в [1]. Кратко их можно описать следующим образом [2]. Изображения в цифровом формате представляют собой набор элементов, который содержит информацию о положении объекта в декартовых координатах, а также о его оптических свойствах. Исходные данные обрабатываются компьютером как параметры специальной математической модели. Это позволяет ими манипулировать таким образом, чтобы улучшить визуальное восприятие всего изображения или отдельных компонентов (*деконволюция изображения*). Кроме того данные, закодированные в цифровом изображении, можно использовать для их количественного анализа. Такой подход называют *компьютерным анализом изображений*. С помощью компьютерного анализа изображений можно *количественно измерять оптические параметры* флуоресценции одновременно с их *пространственными характеристиками*.

Становлению новой аналитической методологии способствовала также модернизация флуоресцентных микроскопов [3]. Появился большой ассортимент коммерчески доступных низкомолекулярных флуорофоров [4]. Новые возможности открыли методы получения и внедрения в клетки микроорганизмов *флуоресцентных белков* (ФБ). Сначала были разработаны методы, основанные на использовании природных или синтезированных гомологах так называемого *зеленого флуоресцентного белка* [5]. Позднее появились методы, позволяющие создавать гибриды внутриклеточных целевых белков со специальной белковой надстройкой, обладающей способностью ковалентно присоединять к себе низко-

молекулярные флуорофоры (так называемые *self-labeling proteins*) [6]. В обоих подходах используются методы молекулярной биологии.

Одним из важнейших результатов применения флуоресцентной микроскопии, сопряженной с компьютерной обработки и анализа цифровых изображений, в сочетании с методами формирования внутриклеточных ФБ явилось создание методов *оптической микроскопии сверхвысокого разрешения* или *оптической наноскопии* [7]. Эти методы позволяют не только различать объекты, расположенные на расстоянии в несколько десятков нанометров друг от друга, но даже отслеживать положение и движение отдельных молекул. Методы микроскопии сверхвысокого разрешения условно делят на две категории. 1) Методы микроскопии локализации единичных молекул, такие как микроскопия с помощью фотоактивации флуоресценции и микроскопия стохастической оптической реконструкции [8]. 2) Методы микроскопии со специальным освещением образцов, такие как микроскопия со стимулируемым подавлением флуоресценции и микроскопия со структурированным освещением [9, 10].

Новая аналитическая методология широко используется в изучении дрожжей и бактерий на *субклеточном уровне*. Приведем несколько примеров.

**Дрожжи.** Разработаны методы *субклеточной микрофлуориметрии* [11] и *морфометрии* единичных клеток [12]. Показана возможность определения локализации отдельных молекул и молекулярных комплексов, в том числе в динамике [13–15].

**Бактерии.** Использование флуоресцентной микроскопии, сопряженной с компьютерной обработки и анализа цифровых изображений, нашло применение в изучении структуры цитоскелета и нуклеоида [16]; динамики транскрипции [17] и трансляции [18]; динамики взаимодействия белков с ДНК [19]; репликации и репарации ДНК [20]; организации систем секреции и внутриклеточной компартментализации [21]; внутриклеточной сигнализации и динамики экспрессии генов [22]; механизмов действия антимикробных соединений [23] и некоторых других исследованиях.

Таким образом, компьютеризация флуоресцентной микроскопии открыла две принципиально новых возможности для изучения микроорганизмов. Первая –количественное измерение разнообразных параметров флуоресценции [24] целевых флуорофоров во взаимосвязи с определенными структурами единичных клеток. Вторая – расширение границ визуализации внутриклеточных компонентов в нанометровый диапазон. Важно также то, что многие методики могут быть реализованы на живых (нефиксированных) клетках. Это выгодно отличает их от методов электронной микроскопии, поскольку открывается перспектива исследования динамики метаболических процессов на субклеточном уровне. Все это определяет особое место современной флуоресцентной микроскопии в наборе аналитических инструментов изучения единичных клеток микроорганизмов [25].

С расширенной версией этого материала можно познакомиться в работе [26], а также в научно-популярной статье [27].

## Литература


1. *Wallace C.T., Jessup M., Bernas T. et al.* (2018) Curr. Protoc. Cytom. 83: 12.2.1–12.2.14.
2. *Puchkov E.* (2021) In: An Introduction to Microorganisms. (Eds. Q-S.Wu, Y-N.Zou, F.Zhang, B.Shu) Nova Science Publishers, Inc., N.Y., Chapter 1: 1–31.
3. Sanderson M.J., Smith I., Parker I. et al. (2014) Fluorescence microscopy. Cold Spring Harb Protoc. 10: pdb. top071795.
4. The Molecular Probes Handbook. (2010) A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. (Eds. I.Johnson, M.Spence). 11th Edition. Moscow: Life Technologies.
5. *Campbell R.E.* (2008) Scholarpedia. 3(7): 5410.
6. *Hinner M.J., Johnsson K.* (2010) Curr. Opin. Biotechnol. 21(6): 766–776.
7. *Requejo-Isidro J*ю (2013) J Chem Biol 6: 97–120.
8. *Lelek, M., Gyparaki, M.T., Beliu, G. et al.* (2021) Nat Rev Methods Primers 1, 39.
9. *Hell S.* (2007) Science. 316(5828): 1153–1158.
10. *Gustafsson M.G.L.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(37): 13081–13086.
11. *Puchkov E.* (2016) In: Advances in Medicine and Biology.(Ed. L.V.Berhardt). Nova Science Publishers Inc., N.Y. 98: 69–90.
12. *Negishi T., Nogami S., Ohya Y.* (2009) J. Biotechnol. 141(3–4): 109–117.
13. *Bjerling P., Olsson I., Meng X.* (2012) J. Vi. Exp. 59: e3454.

14. *Akamatsu M., Lin Y., Bewersdorf J. et al.* (2017) Mol. Biol. Cell. 28(23): 3203–3214.
15. *Arasada R., Sayyad W.A., Berro J. et al.* (2018) Mol. Biol. Cell. 29(3): 295–303.
16. *Yao Z., Carballido-López R.* (2014) Annu. Rev. Microbiol. 68: 459–476.
17. *Stracy M., Kapanidis A.N.* (2017) Methods. 120: 103–114.
18. *Gahlmann A., Moerner W.E.* (2014) Nat. Rev. Microbiol. 12(1): 9–22.
19. *Uphoff S.* (2016) Methods Mol. Biol. 1431: 221–234.
20. *Li Y., Schroeder J.W., Simmons L.A. et al.* (2018) Curr Opin Microbiol. 43: 38–45.
21. *Schneider J.P., Basler M.* (2016) Phil. Trans. R. Soc B. 371(1707): 20150499.
22. *Kentner D., Sourjik V.* (2010) Annu. Rev. Microbiol. 64: 373–390.
23. *Choi H., Rangarajan N., Weisshaar J.C.* (2016) Trends Microbiol. 24(2): 111–122.
24. *Lakowicz J.R.* (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Berlin.
25. *Puchkov E.* (2021) In: Handbook of Single Cell Technologies. (Eds. Santra T., Tseng F.G.) Springer, Singapore. 1–32.
26. *Puchkov E.* (2021) World J. Microbiol. Biotechnol. 37, 189, p. 1–13.
27. Пучков Е.О. (2021) Природа 8 (1272) 3–15.

## Новые лакказные гены аскомицетов рода *Myrothecium* и *Curvularia*

*Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Егорова А.Д., Коломыцева М.П.*

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

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37980

Одними из наиболее известных промышленно ценных ферментов, окисляющих широкий спектр ароматических субстратов с сопутствующим восстановлением атмосферного кислорода до воды, являются лакказы (КФ 1.10.3.2, *n*-дифенол:кислород оксидоредуктазы, фенол оксидазы, «голубые» или медьсодержащие оксидазы), востребованные во множестве биотехнологических процессов (Mate and Alcalde, 2017). При этом особенно ценны лакказы с высоким редокс-потенциалом, термостабильные и активные в области pH, близкой к нейтральной. Внеклеточные нетипичные алкалофильные грибные лакказы обладают рядом преимуществ перед бактериальными, вследствие более высокого редокс-потенциала, а, следовательно, широкой субстратной специфичности.

Основными объектами исследования настоящей работы были гены, кодирующие нетипичные лакказы грибов *Curvularia geniculata* и *Myrothecium roridum*, наиболее активные в нейтрально-щелочной среде (Мясоедова с соав., 2017; Ренфельд с соав., 2019). В ходе проведенных исследований разработаны подходы к изоляции и идентификации трех новых генов нетипичных лакказ грибов *M. roridum* и *C. geniculata*.

На пиках лакказной активности была выделена тотальная матричная РНК и синтезирована соответствующая комплементарная ДНК. Центральные фрагменты исследуемых лакказных генов получали путем амплификации с использованием вырожденных праймеров, комплементарных второму и третьему высоко консервативным участкам известных лакказ. Для получения полных нуклеотидных последовательностей исследуемых лакказ грибов-аскомицетов *M. roridum* и *C. geniculata* был использован метод RACE.

Для установления экзон-интронной структуры генов выделена геномная ДНК исследуемых грибов и проведена амплификация лакказных генов и сравнение последовательностей генов, полученных из кДНК и геномной ДНК, а также выведена аминокислотная последовательность для каждого из лакказных генов. Анализ данных с помощью веб-сервиса SignalP-5.0 показал наличие сигнальных пептидов, а анализ аминокислотных последовательностей с использованием базы данных CDD выявил наличие трех последовательно расположенных купредоксин-подобных доменов, характерных для большинства

грибных лакказ. Кроме того, в последовательностях были идентифицированы четыре высоко консервативных мотива, типичных для семейства медьсодержащих оксидаз и ответственных за связывание меди в Т1 активном центре (HXHG, HXH, HXXHXH и HCHXXXHXXXXM/L/F). Полученные белковые последовательности лакказ содержали от семи до девяти предполагаемых сайтов N-гликозилирования.

Филогенетический анализ в программе Mega 6 лакказы гриба *M. roridum* показал относительно высокую степень гомологии с хромосомными последовательностями аскомицетов родов *Verticillium* и *Fusarium*. Для лакказ гриба *C. geniculata* была показана их близость к нуклеотидным последовательностям генов лакказ грибов родов *Bipolaris* и *Cochliobolus*, а также к генам грибов рода *Alternaria.*

Проведено гомологическое моделирование пространственной структуры доминирующих нетипичных голубых оксидаз грибов *Curvularia geniculata* и *Myrothecium roridum* и сравнительный структурно-функциональных анализ.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059.*

## Литература

1. *Mate D. M., Alcalde M.* Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. Microbial Biotechnology, 2017, Vol. 10, P. 1457–1467.
2. *Мясоедова Н.М., Ренфельд Ж.В., Подъяблонская Е.В., Самойлова А.С., Черных А.М., Классен Т., Пиетрусзка Й., Коломыцева М.П., Головлева Л.А.* Новые аскомицеты- продуценты лакказ. Микробиология, 2017, том 86, № 4, с. 494–503.
3. *Ренфельд Ж.В., Мясоедова Н.М., Гайдина А.С., Черных А.М., Шебанова А.Д., Головлева Л.А., Коломыцева М.П.* Оптимизация условий культивирования гриба *Curvularia geniculata* с целью повышения лакказной активности. Сборник статей «Велес», 2019, с. 13–17.

# Гетерологическая экспрессия катехол 1,2-диоксигеназы бактерии *Rhodococcus opacus* 1CP

*Ренфельд Ж.В.[1], Шайфутдинов Р.Р.[2], Черных А.М.[1], Коломыцева М.П.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, zhanna.renfeld@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37981

Ароматические соединения широко распространены в природе, а также активно используются в промышленности для производства красителей, пестицидов, полимеров, фармацевтических субстанций и т.д.. Множество ароматических соединений (в том числе полиароматических) в процессе аэробной биодеградации расщепляются до катехола или его производных, являющихся ключевыми интермедиатами разложения. Одним из распространенных способов дальнейшей аэробной трансформации катехолов является интрадиольное расщепление ароматического кольца между двумя сопряженными гидроксильными группами катехола, катализируемое катехол-1,2-диоксигеназами микроорганизмов с образованием муконовой кислоты или её производных (Kałduńska et al., 2021). Высокой специфичностью к галоген- и метилзамещенным катехолам обладают (хлор/метил)катехол 1,2-диоксигеназы, с отличной от катехол 1,2-диоксигеназ структурой, катализирующие расщепление субстратов с образованием соответствующих замещенных муконовых кислот.

Катехол- и (хлор/метил)катехол 1,2-диоксигеназы в последнее время находят активное применение в биосенсорах для определения катехолов в пищевой продукции, а также для детекции загрязнений токсичными ароматическими ксенобиотиками почвы и сточных вод. Помимо этого, интерес к катехол 1,2-диоксигеназам обусловлен возможностью их использования для синтеза муконовой кислоты и ее заме-

щенных производных – прекурсоров полимерных материалов с новыми свойствами (Leavitt et al., 2017; Nicolaï et al., 2021).

Ранее нами было показано, что катехол 1,2-диоксигеназа и 3-хлоркатехол 1,2-диоксигеназа бактерии *Rhodococcus opacus* 1CP отличаются по субстратной специфичности, однако имеют идентичный аминокислотный состав поверхности полости активного центра (Ferraroni et al., 2006; Matera et al., 2010; Kolomytseva et al., 2010). В связи с чем возникает вопрос о вкладе координационной сферы $Fe^{3+}$ активного центра в субстратную специфичность катехол 1,2-диоксигеназ.

В ходе исследования была разработана бактериальная система гетерологической экспрессии на основе *E.coli* и экспрессионного вектора, несущего ген катехол 1,2-диоксигеназы из бактерии *R. opacus* 1CP. Амплифицированный из геномной ДНК целевой ген с помощью метода PIPE-клонирования был помещен в плазмиду pET-22b, обеспечивающую его эффективную и индуцируемую экспрессию в растворимой форме. Продемонстрирован высокий выход рекомбинантного фермента в активной форме, способного расщеплять катехол и его замещенные аналоги.

Разработанная система будет в дальнейшем использована для получения мутантных форм катехол 1,2-диоксигеназы бактерии *R. opacus* 1CP с целью исследования влияния аминокислотных замен в окружении координационной сферы железа на субстратную избирательность фермента.

## Литература


1. *Kałduńska K.; Kozakiewicz A.; Wujak M.; Wojtczak A.* (2021) Biological Inspirations: Iron Complexes Mimicking the Catechol Dioxygenases. Materials 14:3250, https://doi.org/10.3390/ma14123250
2. *Leavitt J.M., Wagner J.M., Tu C.C., Tong A., Liu Y., & Alper H.S.* (2017). Biosensor-Enabled Directed Evolution to Improve Muconic Acid Production in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Journal 12(10):1600687, https://doi.org/10.1002/biot.201600687
3. *Nicolaï T., Deparis Q., Foulquié-Moreno M.R. et al.* (2021) In-situ muconic acid extraction reveals sugar consumption bottleneck in a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain. Microb. Cell. Fact. 20:114, https://doi.org/10.1186/s12934-021-01594-3
4. *Kolomytseva M., Ferraroni M., Chernykh A.M., Scozzafava A., Briganti F., Golovleva L.* (2010) Experimental and theoretical affinity studies of substituted phenols to chlorocatechol 1,2-dioxygenases: a step toward the comprehension of inhibitor/substrate binding to intradiol dioxygenases J Mol Cat B: Enzym, 64 (1-2):53-59, http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.02.001
5. *Matera I., Ferraroni M., Kolomytseva M., Golovleva L., Scozzafava A., Briganti F.* (2010) Catechol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts. J Struct Biol, 170(3):548-564, https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.12.023
6. *Ferraroni M., Kolomytseva M.P., Solyanikova I.P., Scozzafava A., Golovleva L.A., Briganti F.* (2006) Crystal structure of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase key enzyme of a new modified *ortho*-pathway from the gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP grown on 2-chlorophenol. J. Mol. Biol. 360(4):788-799, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.046


# Формирование трехмерных структур из клеток млекопитающих под воздействием полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты


*Рысцов Г.К.[1,2], Лисов А.В., Земскова М.Ю.[1,2]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Московский государственный областной университет, Москва, gleb.8.ristsoff@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37982


Прикреплённые к подложке клетки, выращенные в двухмерной (2Д) культуре или схожем формате суспезионных культур, имеют меньшую значимость в качестве моделей для исследований, по сравне-

нию с клетками, растущими in vivo как трёхмерные структуры в составе тканей различных органов [1]. Сфероиды, являясь трехмерными (3Д) образованиями, более точно воспроизводят структуру органов или новообразований и демонстрируют повышенную по сравнению с 2Д культурами выживаемость, соответствующую морфологию и гипоксическое ядро, которое наблюдается в нативных опухолях in vivo. Сфероиды опухолевых клеток также представляют модели процесса метастазирования. Поэтому, в настоящее время сфероиды широко используют для тестирования новых противоопухолевых препаратов [2]. Однако, многие методы получения 3Д культур имеют множественные недостатки, такие как высокая стоимость применения, высокая длительность формирования сфероидов, существенное влияние способа на метаболизм клеток, способное снизить достоверность применения в качестве тест-системы, и другие [3-5].

Нами было обнаружено, что инкубирование раковых и нормальных клеток в присутствии нетоксичных полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты (поли-2,5-ДГБК) способно индуцировать формирование 3Д-структур. На основании этого был разработан новый способ быстрого получения 3Д-культур, не требующий использования дополнительного оборудования, дорогостоящих реактивов и не оказывающий долговременного влияния на клеточный гомеостаз. Сфероиды могут быть получены как из опухолевых или нормальных клеток, так и из смешанных (гетерологичных) клеточных культур, представляющих ко-культивированные клетки различных типов. Способ получения трехмерных культур включает несколько вариантов, позволяющих получать сфероиды с различными свойствами. Первый вариант получения сфероидов основан на культивировании суспензии клеток в стандартной для них ростовой среде в присутствии полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты (2,5-ДГБК) с последующей отмывкой сфероидов от полимеров и переносом в стандартную для данного типа клеток ростовую среду. Таким образом, сформированный сфероид представляет множественное количество клеток, форсированных к росту в трёхмерной структуре в присутствии полимеров 2,5-ДГБК. Второй вариант основан на культивировании клеток до стадии монослоя, с последующим откреплением от подложки при помощи механического воздействия (например, скребком или шпателем). Полученные при откреплении клеток клеточные агрегаты инкубируют в стандартной для данных типов клеток ростовой среде с добавлением полимеров 2,5-ДГБК с последующим удалением полимеров и переносом сформированных сфероидов в стандартную для данного типа клеток ростовую среду. Третий вариант основан на посеве клеток на низкоадгезивные 96 луночные планшеты (одна клетка на лунку) и культивирование до образования клонов (50-100 клеток) с последующей сменой среды на стандартную ростовую среду с добавлением полимеров 2,5-ДГБК. После этого производится инкубация клеток до стадии формирования сфероидов, и после удаления полимеров сфероиды культивируют в стандартной для данного типа клеток ростовой среде. В отличие от двух предыдущих вариантов, сфероиды, полученные этим методом «клонирования», представляют трехмерные культуры, полученные из единичных клеток. Полученные во всех вариантах сфероиды демонстрировали стабильный рост после завершения формирования и способность к прикреплению к подложке и миграции клеток.

Также мы проверили, способны ли полимеры 2,5-ДГБК долговременно влиять на сигнальные пути клеток, регулирующие клеточный гомеостаз т.к. подобное воздействие способно ограничивать использование полученных таким образом сфероидов для скриннинга лекарственных средств. После проведения фосфопротеомного анализа было обнаружено, что обработка полимерами 2,5-ДГБК приводит к ингибированию киназ группы Akt в клетках, растущих в 2Д-культуре. Для изучения влияют ли полимеры на активность киназ при формировании сфероидов, мы исследовали уровень фосфорилирования Akt в сфероидах клеток рака предстательной железы LnCaP. Для этого сформированные по нашей методике сфероиды были перенесены в флаконы с неадгезивным покрытием и культивированы в течении 48 часов в ростовой среде с отбором проб через 0, 24 и 48 часов после удаления полимеров. В качестве контроля были использованы клетки LNCaP, культивированые до стадии монослоя в двухмерной культуре. Относительные уровни экспрессии белка определяли методом вестерн блот анализа и денситометрией сигналов. Результаты показали, что в 3Д-культурах под воздействием полимеров 2,5-ДГБК происходит ингибирование активности Akt, наблюдаемое как снижение уровня фосфорилирования киназы. Однако, инкубация сфероидов в отсутствии полимеров 2,5-ДГБК приводит к постепенному восстановлению фосфорилирования Akt до уровня, сопоставимого с активностью киназы в клетках, не подвергавшихся обработке полимерами. Следовательно, через 48 часов после удаления полимеров, клеточные сфероиды можно использовать для последующих экспериментов и скрининга лекарственных препаратов,

поскольку действие полимеров 2,5-ДГБК является временным и жизнедеятельность клеток сфероидов полностью восстанавливается до нормального уровня после удаления соединения.

## Литература


1. *Egeblad M., Nakazone E.S., Werb Z.* Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. Dev. Cell 2010, 18, 884-901
2. *Mulholland T., McAllister M., Patek S., et al.* Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient. Sci Rep. 2018;8(1):14672. Published 2018 Oct 2. doi:10.1038/s41598-018-33055-0
3. Directing the Self-assembly of Tumour Spheroids by Bioprinting Cellular Heterogeneous Models within Alginate/Gelatin Hydrogels Tao Jiang, Jose G. Munguia-Lopez, Salvador Flores-Torres, Joel Grant, Sanahan Vijayakumar, Antonio De Leon-Rodriguez & Joseph M. Kinsella Scientific Reports 7, Article number: 4575 (2017)
4. *Akasov R., Gileva A., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva E.* 3D in vitro co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // Biotechnol Lett. 2017 Jan;39(1):45-53
5. *Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M.* RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. Nature. 1999 Feb 11;397(6719):534-9. PubMed PMID:10028971.


# Новые оксидоредуктазы органофосфонатов у почвенных бактерий *Achromobacter* и *Ochrobactrum*: неизвестные ферменты известных метаболических путей


*Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрябина РАН),
alhummen@rambler.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37983


Фосфор – один из важнейших биогенных элементов, представленный в живых организмах не только в виде фосфатов, но и в виде органофосфонатов (ОФ) – соединений с устойчивой ковалентной связью углерод-фосфор (C–$P^{3+}$ связь). ОФ выполняют функции антибиотиков, компонентов мембран, запасных веществ. Поступление ОФ в окружающую среду первоначально связывали с деятельностью человека; антропогенные ОФ расцениваются как стойкие загрязнители окружающей среды; по объемам производства среди них лидирует неселективный гербицид глифосат (ГФ). Недавно также выявлены мощные природные источники ОФ, связанные с жизнедеятельностью прокариот в мировом океане и оказывающие заметное влияние на глобальный круговорот фосфора.

Биодеградация природных и антропогенных ОФ предусматривает три механизма высвобождения фосфата: свободнорадикальный (ферментный комплекс «C–P лиаза»), гидролитический (узкоспецифичные C–P гидролазы) и окислительный (металлосодержащие диоксигеназы). Так как в природе ОФ представлены, в основном, 2-аминоэтилфосфонатом (2-АЭФ), среди прокариот наиболее распространен фосфоноацетальдегидгидролазный (фосфонатазный) путь утилизации ОФ, кодируемый опероном *PhnRSTUVWX*, где PhnR – регулятор экспрессии, PhnSTUV – система трансмембранного переноса 2-АЭФ, PhnW – трансаминаза, превращающая 2-АЭФ в субстрат фосфонатазы и PhnX – собственно, фосфонатаза. Основной механизмом деструкции антропогенного ГФ – оксидоредуктазный, за счет превращения гербицида в аминометилфосфонат (АМФК) под действием ГФ-оксидоредуктазы (GOR) либо глициноксидазы (GOX). АМФК затем метаболизируется либо по C–P лиазному, либо по фосфонатазному пути.

Ранее из лабораторной коллекции был отобран и изучен ряд эффективных бактерий -деструкторов ГФ и природных ОФ, принадлежащих к видам *Achromobacter insolitus* (штамм Kg 19), *A. aegrifaciens* (штамм Kg 16) и *Ochobactrum anthropi* (штамм GPK 3). Все они способны потреблять ГФ (через превращение в АМФК) и 2-АЭФ как единственные источники фосфора, что предполагало наличие у них ГФ-оксидоредуктазы и фосфонатазного пути. Однако секвенирование, аннотирование и анализ их геномов выявили существенные различия между ожидаемой картиной, основанной на литературных данных и фактической организацией детерминант ферментных путей катаболизма ОФ. Ни у одного из штаммов не выявлены гены *GOX* или *GOR* либо их гомологи. Ген трансаминазы *PhnW* у ахромобактеров располагался на значительном расстоянии от их фосфонатазных оперонов, а у *O. anthropi* отсутствовал. Сами фосфонатазные опероны, соответственно, имели вид |*HpnW*|*PhnS*|*PhnX*|*PhnU*|*PhnT*|*PhnR*|*PhnHD*| у Kg 19 и Kg 16 и |*HpnW*|*PhnX*|*PhnV1*|*PhnV2*| у GPK 3, где HpnW – гипотетическая флавиновая оксидаза, гомологи которой обнаружены у ряда бактерий в составе генных кластеров, обеспечивающих утилизацию ОФ. PhnHD первоначально ошибочно аннотирована как HD-(гистидин-аспартат)-доменная фосфогидролаза. Но с учетом геномного контекста и литературных данных наиболее вероятна принадлежность PhnHD к небольшой группе новых негемовых $Fe^{2+/3+}$-содержащих диоксигеназ, обеспечивающих расщепление C–P связи аминофосфонатов. Как и два изученных представителя этой группы: PhnZ (EC 1.13.11.78) и TmpB (1.13.11.90), PhnHD штаммов Kg 19 и Kg 16 включали 5, а не 4, как прочие представители семейства HD, консервативных гистидина. В PhnHD присутствовали также характерные для активных центров PhnZ и TmpB тирозин (20) и альфа-спираль (96-106) (рис. 1).

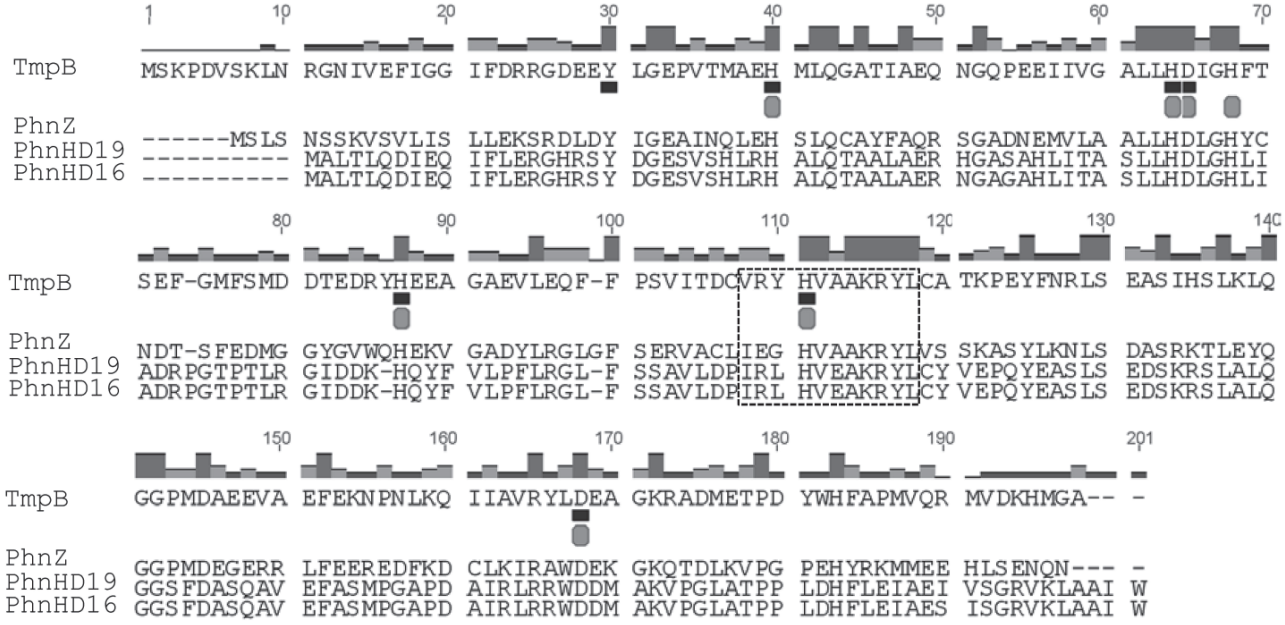



**Рис. 1.** Выравнивание аминокислотных последовательностей гипотетических диоксигеназ *A. insolitus* Kg 19 (PhnHD19) и *A. aegrifaciens* Kg 16 (PhnHD16) против известных C–P-деградирующих оксигеназ TmpB и PhnZ. Столбцы сверху – степень идентичности а/к остатков; прямоугольники – а/к остатки, входящие в активные центра фермента; овалы – характерные для ОФ-специфичных диоксигеназ консервативные остатки гистидина и аспартата; пунктир – участвующая в формировании активного центра α-спираль

Для новой флавиновой оксидазы HpnW не выявлена значимая гомология с известными FAD-содержащими оксидоредуктазами, в том числе GOX/GOR. Так как *HpnW* замещает собой ген трансаминазы *PhnW* в фосфонатазных оперонах изучаемых бактерий, данный фермент может служить функциональным аналогом PhnW, обеспечивая превращение 2-АЭФ в субстрат фосфонатазы путем окислительного деаминирования, а не переноса аминогруппы на пируват. В противном случае утилизация 2-АЭФ у *O. anthropi* GPK 3, лишенного *PhnW*, была бы невозможной. В силу отсутствия у перечисленных штаммов ГФ-оксидоредуктазы, интересен вопрос участия HpnW в превращении ГФ в АМФК с учетом экспрессии фосфонатазного оперона у штаммов Kg 19 и GPK 3 в ответ на рост на среде с ГФ.

Были подобраны праймеры:

PhnHD1619NdeF:
5' TAACATATGGCCTTGACCTTG 3'

PhnHD19XhoR:
5' TTCTCGAGCCAAAT GGCAGCC 3'

PhnHD16XhoR:
5' TTCTCGAGCCAGATGGCAGCC 3'

HpnW19NdeF:
5' TAACATATGAAAAAATTCGACGTAGTCGTGGTGG 3'

HpnW16NdeF:
5' TAACATATGAAAAATTTCGACGTAGTCGTGGTGG 3'

HpnW19XhoR:
5'°TTCTCGAGGCGGCCCAGCACG 3'

HpnW16XhoR:
5' TTCTCGAGGCGGCCCAGCACAC3'

позволившие получить ампликоны в виде полных копии генов *PhnHD* и *HpnW* с фланкирующими участками с сайтами узнавания рестриктаз NdeI и XhoI при ПРЦ по матрице геномной ДНК штаммов *A. insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16. Получены конструкции на основе вектора pET-22b для гетерологической экспрессии новых оксидоредуктаз, несущих полигистидиновую метку на С-концах в *E. coli* с целью изучения роли данных ферментов в катаболизме ОФ и, прежде всего, выявления их природных субстратов. Решение данной задачи внесет существенный вклад в понимание биосферного круговорота фосфора и механизмов приспособления прокариот к существованию в условиях загрязнения ОФ.

## Действие наночастиц алмаза и графита на биологические системы штамма *Escherichia coli* K12 TGI

*Сорокина Е.В.[1], Образцова Е.А.[2]*

[1] Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова г. Москва, evsorokina77@mail.ru

[2] Институт Биоорганической химии им. ак. М. М, Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37984

В настоящее время исследование взаимодействия наночастиц различной природы с биологическими объектами вызывает повышенный интерес, вызванный началом широкого применения нанообъектов в продуктах массового и промышленного потребления. Однако воздействие используемых наноматериалов на биологические системы, в том числе и на человека, полностью не изучено.

Ранее мы обнаружили, что воздействие одностенных и многостенных углеродных нанотрубок на бактериальные клетки приводит к их разрушению [1]. Для объяснения этого эффекта в данной работе мы провели анализ воздействия двух других видов углеродных наночастиц – из алмаза и графита – на бактериальные клетки. Алмазные частицы нанометрового размера применяют как маркеры для мониторинга различных биомедицинских образцов [2] и нано – и микрочастицы графита используют в смазочных материалах, для создания проводящих и поглощающих покрытий (в антеннах, детекторах) [3, 4]. Таким образом, каждый человек сталкивается с этими частицами повсеместно.

Было изучено влияние на бактериальные клетки наночастиц алмаза, полученных детонационным методом и графита, полученных методом обработки ультразвуком. Исследование морфологии клеток бактериального биотеста с созданным светящимся фенотипом до и после взаимодействия с углеродными наночастицами было проведено методом сканирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа Zeiss Merlin. Для проведения измерений бактериальные клетки наносились на чистые кремниевые подложки.

Оценка первичной интегральной токсичности проводилась с помощью бактериального люминесцентного теста на бактериях *Escherichia coli* K12 TGI с созданным светящимся фенотипом (биосенсор Эколюм-08). Регистрировали изменения люминесценции после воздействии наноматериалов на люминометре Биотокс.

Анализируя концентрации, исследуемых наночастиц на их биологическую активность, можно выделить зоны концентраций, где каждый вид наночастиц был нетоксичен, токсичен или очень токсичен. Частицы алмаза и графита в диапазоне концентраций до 165 мкг/мл были нетоксичны, индекс токсичности регистрировали в значениях T ~ -28 и T ~ -21 соответственно. Многие авторы принимают показатели стимуляции люминесценции биотеста как токсическое действие ксенобиотиков незначимым [5]. Некоторые связывают стимуляцию люминесценции светящихся бактерий с механизмом действия веществ высокой липофильности, в то время как гидрофильные вещества преимущественно вызывают эффект тушения люминесценции. При этом стимуляция и ингибирование свечения бактерий является показателем проявления биологической активности [6].

На сегодняшний день используются различные подходы для оценки токсичности веществ, негативное действие которых может, проявляется отдаленно во времени и эти вещества способны нарушать метаболические процессы, протекающие в клетке и влиять на репродукцию клеток. В нашей работе мы также проанализировали прирост биомассы *E. coli* на среде LB с помощью мониторинга ОП при 560 нм и дополнительно регистрировали показатель КОЕ. Исследование кривой роста бактерий после инкубации с наночастицами позволило оценить истинное значение токсичности и биологическую активность исследуемых веществ. Оптическая плотность клеток после обработки клеток наночастицами алмаза возросла максимально на 3%. Можно предположить, что наночастицы алмаза в исследованных концентрациях не оказывали влияние на клеточное деление. Однако частицы графита стимулировали рост оптической плотности и к 20 часам роста клеток наблюдался значительный прирост биомассы в 2,5 раза. Ростовые характеристики клеток изменялись после инкубации с наночастицами графита, стимулируя рост и по плотности, и по КОЕ. Считается, что в зависимости от концентрации наночастиц у микроорганизмов могут активироваться адаптационные механизмы регуляции на уровне генома, в результате которых, бактерии приобретают устойчивость, становиться способны выживать, в условиях стресса [7].

На основании данных биолюминесценции и растровой электронной микроскопии показано, что данные виды наночастиц не являются токсичными для бактериальных клеток, не оказывают повреждающее действие в отличие от углеродных нанотрубок [1].

Полученные результаты демонстрируют также, что безопасность наноматериалов зависит не только от их состава, но и от внутренней структуры наночастиц. Следовательно, нет ни вредных, ни полезных наночастиц – есть только вредные и полезные количества, попадающие в организм. Биотестирование помогает быстро и точно указать какие наноматериалы и при каких условиях и когда безопасны, а для небезопасных будут разработаны и установлены условия и нормы их применения.

## Литература


1. *Зарубина А.П., Лукашов Е.П., Деев Л.И., и др*. Оценка рисков токсичности углеродных наноматериалов. Нано- и микросистемная техника. 2011. № 10. С. 21–26.
2. *Wu Y., Jelezko F., Plenio M., Weil T.* Diamond Quantum Devices in Biology Angewandte Chemie International Edition. 2016. V. 55. P. 6586–6598.
3. *Meng F., Wang H., Huang F., et al.* Graphene-based microwave absorbing composites: A review and prospective. Composites Part B. 2018. V. 137. P. 260–277262.
4. *Pete Scala E.* A Brief History of Composites in the U.S.-The Dream and the Success. Journal of the Minerals. 1996. V. 48. P. 45–48.
5. *Зарубина А.П., Сорокина Е.В.* Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода. Успехи современной биологии. 2017. Т. 137, № 6. С. 613–620.
6. *Дерябин Д.Г.* Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. – 246 с.
7. *Зарубина А.П., Сорокина Е.В., Пархоменко И.М., Гапочка М.Г.* Действие нейромедиаторов в условиях искусственного электромагнитного загрязнения среды. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. № 6. С. 20–30.

# Жирнокислотный состав бактерий рода *Rhodococcus* – один из маркеров адаптации к пониженным температурам

*Суворова В.В.[1], Колыхалов Д.А.[2]*

[1] Тульский государственный университет, Тула, suvorova.victoria.2010@mail.ru
[2] Тульский государственный университет, Тула, Laften_71rus@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37985

Микроорганизмы рода *Rhodococcus* относятся к неспорообразующим актиномицетам, обладающим широким метаболическим потенциалом и способным выживать в различных экстремальных условиях (сезонные изменения температуры, pH, солёности, водный стресс (высыхание), ограничение азота, недостаток питательных веществ, окислительный стресс, действие токсических растворителей) [1]. Их устойчивость к неблагоприятным факторам связана со строением клеточной стенки и большим набором ферментных систем. На основе представителей *Rhodococcus spp.* создаются биопрепараты для биоремедиации загрязнённых почвенных и водных экосистем при различных условиях окружающей среды [2].

Текучесть мембран является наиболее важным параметром, определяющим жизнеспособность клеток, что проявляется в изменении состава жирных кислот, длины их цепей и фосфолипидного состава. Другими механизмами адаптации бактерий к стрессовым воздействиям могут быть изменения морфологии клеток, состава миколовых кислот, активности ферментов и метаболической активности клеток [3].

Целью данной работы являлся сравнительный анализ жирнокислотного состава бактерий рода *Rhodococcus* в зависимости от температуры культивирования.

В работе были использованы 4 штамма бактерий, а именно *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ар, *Rhodococcus qingshengii* F2, *Rhodococcus erythropolis* X5 и *Rhodococcus erythropolis* S67, предоставленные лабораторией биологии плазмид ИБФМ РАН. Для определения общего содержания липидов проводили экстрагирование влажной биомассы бактерий, полученной при выращивании 4 штаммов бактерий на среде с н-гексадеканом при 26 °С и 2 штаммов при 10 °С, неполярными органическими растворителями – хлороформ:метанол (1:2) [4]. Переэтерификацию эфиров жирных кислот проводили метанолом [5]. Жирнокислотный состав липидов определяли методом газовой хроматографии [6], используя стандартную смесь метиловых эфиров жирных кислот «Bacterial acid methyl esters CP mixture», состоящую из 26 метиловых эфиров. Для определения жирных кислот проводили идентификацию метиловых эфиров жирных кислот сначала стандартной смеси, а затем сравнивали времена выхода компонентов исследуемых образцов с временами выхода компонентов стандартного образца.

Газохроматографический анализ состава метиловых эфиров жирных кислот при культивировании бактерий при 26 °С показал, что для бактерий *Rhodococcus qingshengii* F2 преимущественными кислотами являются 12-метилтетрадекановая кислота (40,6%) и эйкозановая кислота (21%). Преобладающими для бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ар являются пентадекановая (26%), 14-метилпентодекановая (23%), олеиновая (33%) кислоты. Для бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67 доминирующей является пентадекановая кислота (52%), а также 14-метилпентодекановая (15,9%) и тридекановая кислота (10,2%). А для бактерий *Rhodococcus erythropolis* X5 основной оказалась пентадекановая кислота (47%), также в заметных количествах обнаружены: олеиновая (12.2%), 3-гидроксидодекановая (10,7%) и ундекановая кислоты (9,1%).

При понижении температуры культивирования до 10 °С происходило изменение жирнокислотного состава бактерий. Для бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67 преимущественной кислотой оказалась олеиновая (61%), в заметных количествах обнаружены нонадекановая (15%) кислота и пентадекановая (11%) кислота. Для *Rhodococcus erythropolis* X5 доминирующей также оказалась олеиновая кислота (59,3%) и в заметных количествах обнаружена пентадекановая кислота (10%).

Сопоставление жирнокислотных профилей микроорганизмов, выращенных при разных температурах культивирования, выявляет их адаптационные особенности. Так, сравнение состава жирных кислот бактерий *R. erythropolis* S67, выращенных при 26 °С и 10 °С, показывает, что данные микроорга-

низмы адаптируются к пониженной температуре за счет изменения своего жирнокислотного состава, а именно увеличения содержания изомерной жирной кислоты (C18:1 – 61%), обнаружения гидроксилированной кислоты (C14:0 3-OH – 6%), которая раннее не обнаруживалась. Также происходит снижение содержания прямоцепочечных насыщенных кислот, однако обнаруживается нонадекановая кислота, ранее не идентифицированная в данном штамме при 26 °C. У *R. erythropolis* S67 только при 10 °C идентифицирована изомерная кислота (C17:1 – 5%). Штамм *R. erythropolis* X5 показывает адаптивную способность к пониженной температуре за счёт изменения состава жирных кислот липидов в клеточной стенке, а именно увеличения содержания изомерной жирной кислоты (C18:1 – 59,3%), обнаружения гидроксилированной кислоты (C14:0 3-OH – 5,5%), которая раннее не обнаруживалась. Также происходит снижение содержания прямоцепочечных насыщенных кислот и обнаруживается метилированная кислота (C17:0 iso – 2%). Ещё у *R. erythropolis* X5 только при 10 °C идентифицирована изомерная кислота (C17:1 – 2%).

Таким образом, проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что адаптация родококков при пониженной температуре происходит благодаря повышению степени ненасыщенности жирных кислот, т.е. введению двойной связи в структуру жирных кислот специфической десатуразой, также увеличению метильного разветвления, изменению соотношения антиизо:изо кислот, жирных кислот с цис- и транс-конформацией.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Соглашение от «29» сентября 2021 г. № 075-03-2021-170/5 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).*

## Литература

1. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A.* Responses to ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *rhodococcus* species // Pathogens. 2021. V. 10, № 8. P. 1–22.
2. *De Carvalho C.C.C.R.* Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions // Res. Microbiol. Elsevier Masson SAS, 2012. V. 163, № 2. P. 125–136.
3. *Ali P., Hasan F., Khan S., Badshah M., Shah A.A.* Cold-adapted halotolerant *Rhodococcus sp.* BGI-11, a potential candidate for biotechnological applications // Int. J. Biosci. 2019. V. 15, № 2. P. 475–489.
4. ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. Введ. 2014-01-01. М.: Стандартинформ, 2019. 27 с.
5. *Eder K.* Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1995. – V. 671. – №. 1-2. – P. 113–131.
6. ГОСТ 31663-2012 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. Введ. 2014-01-01. М.: Стандартинформ, 2019. 12 с.

# Получение рекомбинантных микробных родопсинов представителей семейства *Geodermatophilaceae*

*Тарлачков С.В.[1,2], Стародумова И.П.[1], Буева О.В.[1], Шевчук Т.В.[2]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
sergey@tarlachkov.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37986

Микробные родопсины представляют собой большое семейство ретинальных белков, состоящих из 7 трансмембранных α-спиралей и выполняющих фоторецепторную функцию, а также функцию ион-

ных насосов в процессах преобразования световой энергии [1]. Родопсины широко распространены у бактерий, обитающих в водных экосистемах (пресноводных, слабосоленых, морских). Лишь небольшое число этих белков было охарактеризовано до наших исследований у бактерий, выделенных из неводных мест обитания.

Ранее нами сообщалось об обнаружении широкого спектра родопсинов у актинобактерий семейства *Geodermatophilaceae* [2, 3]. Представители семейства характеризуются нетребовательностью к условиям роста и зачастую являются первопроходцами на различных «неудобных» субстратах, бедных органическим веществом. Обычно встречаются в засушливых районах с высоким уровнем солнечной радиации, в частности, в почвах пустынь, а также в высокогорных почвах, на поверхностях скал и памятников архитектуры (древних стен, фресок, мрамора), которые характеризуются колебаниями доступной воды, низкой концентрацией питательных веществ и высоким уровнем солнечного излучения [4, 5].

Методами биоинформатики нами были обнаружены 4 группы родопсинов в штаммах семейства *Geodermatophilaceae*: DTE-группа (родопсины, предположительно, выполняющие функции протонных насосов), NDQ-группа (предположительно, натриевые насосы), NTQ-группа (предположительно, хлорные насосы) и группа гелиородопсинов (HeR). Филогенетический анализ и наличие замены высококонсервативного триптофана на фенилаланин в положении 182 позволили выделить две подгруппы (DTEW и DTEF) в составе DTE-группы родопсинов.

В настоящей работе проведено клонирование генов, оптимизация экспрессии и очистки 7 белков (Таблица). По одному представителю было взято из DTEW-подгруппы, NDQ- и NTQ-групп. По 2 представителя – из подгруппы DTEF, наиболее обширной (включающей почти половину всех известных родопсинов) и группы гелиородопсинов, наименее изученной (в частности, до сих пор не установлена их биологическая функция). В качестве источников генов были выбраны преимущественно типовые штаммы видов *Geodermatophilaceae.*

Были разработаны праймеры, позволившие получить ампликоны 7 полноразмерных генов родопсинов с фланкирующими участками с сайтами узнавания рестриктаз NdeI и XhoI. Последовательность гена DTEF-родопсина штамма Geodermatophilus obscurus VKM Ac-658$^T$ содержит сайт узнавания рестриктазы XhoI, поэтому нами были разработаны дополнительные праймеры и проведен предварительный SOE-PCR (splicing by overlap extension PCR) для сайт-направленного мутагенеза с целью устранения сайта XhoI без изменения аминокислотной последовательности белка. Ампликоны были клонированы в экспрессионный вектор pET-30b(+). Полученные конструкции содержали полноразмерные гены родопсинов с дополнительной последовательностью LEHHHHHH на С-конце целевых белков.

*Таблица*

| Источник гена | Группа родопсина | Наилучший экспрессионный штамм | Оптимальная концентрация IPTG (мМ) |
|---|---|---|---|
| *Geodermatophilus obscurus* VKM Ac-658$^T$ | DTEF | *E. coli* C43(DE3) | 0.5 |
| *Geodermatophilus dictyosporus* VKM Ac-659$^T$ | DTEW | *E. coli* BL21(DE3) | 0.01 |
| *Geodermatophilus dictyosporus* VKM Ac-659$^T$ | DTEF | *E. coli* C43(DE3) | 0.5 |
| *Modestobacter caceresii* DSM 101691$^T$ | NDQ | *E. coli* C43(DE3) | 0.5 |
| *Geodermatophilus* sp. DSM 44513 | NTQ | *E. coli* C43(DE3) | 0.5 |
| *Geodermatophilus pulveris* DSM 46839$^T$ | HeR | *E. coli* BL21(DE3) | 0.01 |
| *Blastococcus aggregatus* VKM Ac-1606$^T$ | HeR | *E. coli* BL21(DE3) | 0.01 |

При оптимизации условий экспрессии было использовано несколько экспрессионных штаммов *E. coli* – BL21(DE3), C41(DE3) и C43(DE3), несколько концентраций IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), несколько температур и длительности индукции. Уровень экспрессии целевых белков оценивался визуально по окрашиванию осадка клеток. В целом, для всех конструкций удалось подобрать условия экспрессии (Таблица), при которых наблюдается достаточно высокий уровень выхода белка, за исключением гелиородопсина из штамма *G. pulveris* DSM 46839$^T$. По-видимому, это связано с наиболее высоким GC-составом гена (около 73%) и возможным формированием обильного количества

вторичных структур мРНК. Во всех случаях оптимальным и наиболее удобным было проведение индукции при 37 °C в течение 4–5 часов и концентрации ретиналя в среде культивирования 13 мкМ.

Для выделения белка клеточную биомассу разрушали ультразвуком, мембранную фракцию осаждали ультрацентрифугированием, затем проводили экстракцию мембранных белков с использованием буфера с DDM (n-Dodecyl β-D-maltoside). Очистку родопсинов проводили на Ni-IDA агарозе согласно рекомендациям производителя. Наличие целевого белка и его чистоту подтверждали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Чистота полученных препаратов родопсинов составила 80–90% при выходе 2–10 мг из 1 литра культуры (кроме гелиородопсина из штамма *G. pulveris* DSM 46839$^T$, выход менее 0.3 мг/л при значительно меньшей чистоте).

Дальнейшие исследования позволят обогатить знания о разнообразии микробных родопсинов и выявить кандидатов с уникальными свойствами, перспективных для использования в оптогенетике – одной из передовых технологий в нейробиологии.

## Литература


1. *Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., et al.* (2014). Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chemical reviews*, 114(1), 126–163.
2. *Vasilenko O.V., Tarlachkov S.V., Starodumova I.P., et al.* (2017). Draft Genome Sequence of *Modestobacter* sp. VKM Ac-2676 from soil in the area of sharply continental climate. *Biorxiv*, 179697.
3. *Tarlachkov S.V., Shevchuk N.V., Montero-Calasanz M., et al.* (2020). Diversity of rhodopsins in cultivated bacteria of the family *Geodermatophilaceae* associated with non-aquatic environments. *Bioinformatics*, 36(6), 1668–1672.
4. *Normand P., Benson D.R.* (2012). Family IV. *Geodermatophilaceae* Normand 2006, 2277VP Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria, Part A. 2nd ed., Springer, New York, NY, 528.
5. *Eppard M., Krumbein W.E., Koch K., et al.* (1996). Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, stones, and monument surfaces. *Arch. Microbiol.*, 166(1), 12–22.


# Определение чувствительности *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* к препарату «Арбидол»


*Титова Т.Ю., Улыбина А.В.*

Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, г. Самара, ttitova2001@yandex.ru , ulybina_2001@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37987


Препарат «Арбидол» (умифеновир гидрохлорид) входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения как противовирусный препарат. Он является самым популярным среди населения для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ [1]. В связи с этим актуальным является изучение антибактериального воздействия арбидола.

Целью нашего исследования стало определение влияния различных концентраций умифеновира гидрохлорида на рост *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* на агаре.

## Методы исследования

Методика приготовления раствора препарата «Арбидол» состояла в следующем: капсулу препарата «Арбидол», содержащего 100 мг изучаемого вещества, измельчали в ступке и облучали в УФ-генераторе с лампой Philips G3078, λ 275 нм в течение 30 минут. Получившийся порошок растворяли в ДМСО. Полученную суспензию центрифугировали в режиме 4000 об/мин, 15 мин. Надосадочную жидкость использовали как основной раствор умифеновира гидрохлорида с концентрацией 10 мг/мл. Для подтверждения присутствия умифеновира гидрохлорида в растворе проводили качественную реакцию на

хлориды, которая оказалась положительной [2]. Из основного раствора готовили растворы следующих концентраций: 0,05 мг/мл; 0,10 мг/мл; 0,15 мг/мл; 0,20 мг/мл.

В качестве тестовых культур использовали *Escherichia coli* М-17 и выделенный из воздуха штамм *Staphylococcus aureus,* который при проверке оказался чувствительным к β-лактамам.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли, используя методику серийных разведений препарата в агаре. Были использованы следующие концентрации: 0,05 мг/мл; 0,10 мг/мл; 0,15 мг/мл; 0,20 мг/мл; 1 мг/мл. Контролем служил агар с добавлением ДМСО. Учитывали наличие роста культуры через 24 часа [3].

Для определения зон ограничения и отсутствия роста *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* на МПА в чашках Петри наносили стерильные диски из фильтровальной бумаги (d = 5 мм), содержащие концентрации препарата: 0,10 мг/мл; 0,15 мг/мл; 0,20 мг/мл. Контролем служили диски с ДМСО. Инкубацию осуществляли при 37 °С в течение 24 часов [4].

## Результаты исследования

Минимальную подавляющую концентрацию «Арбидола» для *Staphylococcus aureus* выявить не удалось, так как данный штамм не осуществлял роста при добавлении растворов умифеновир гидрохлорида в агар. Минимальная подавляющая рост концентрация умифеновира гидрохлорида при добавлении его в агар для *Escherichia coli* М-17 составляет 0,1 мг/мл.

При выращивании штамма *Staphylococcus aureus* с дисками, содержащими умифеновир гидрохлорид, наблюдаются только зоны ограничения роста, то есть арбидол оказывает только дозозависимое бактериостатическое действие на рост золотистого стафиллококка. При концентрации умифеновира гидрохлорида 0,1 мг/мл зоны ограничения роста на 29% больше, чем в контроле, а при концентрации 0,2 мг/мл больше в 3 раза.

При выращивании штамма *Escherichia coli* М-17 с дисками, содержащими умифеновир гидрохлорид, наблюдается бактерицидное действие концентраций 0,15 мг/мл и 0,2 мг/мл, зоны отсутствия роста по сравнению с контролем выше на 11% и 12% соответственно и бактериостатическое действие при концентрации 0,1 мг/мл – зоны ограничения роста выше контроля на 11,5%, 0,15 мг/мл – на 12,5%, 0,2 мг/мл в 2,7 раз.

Таким образом, лекарственный препарат «Арбидол», используемый как эффективное противовирусное средство, оказывает и достоверное антибактериальное действие, в основном выраженное дозозависимое бактериостатическое действие как на *Staphylococcus aureus,* так и на *Escherichia coli.* Более слабо выраженное бактерицидное действие обнаруживается по отношению к *Escherichia coli M-17.*

## Литература


1. Перечень необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2015 год: распоряжение Правительства РФ от 30 декабря 2014 г. № 2782-р // Собрание законодательства РФ. – 2015 г. – № 3. – С. 597.
2. Общая фармакопейная статья 1.2.2.0001.15. Общие реакции на подлинность. – Государственная фармакопея Российской Федерации. XI изд., вы. 1, 2015.
3. *Детушева Е.В.* Моделирование биопленки на плотной питательной среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану / Е. В. Детушева // диссертация канд. биол. наук 03.02.03 – Оболенск, 2016. – С. 58.
4. МУ 4.2.1890-0.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. – М., 2004. – С. 18–40.

# Особенности физиологии штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с нокаутом гена полифосфатсинтетазы Vtc4

*Томашевский А.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), alla@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37988

Клетки дрожжей содержат значительное количество неорганических полифосфатов (полиР), которые участвуют в гомеостазе фосфора, контроле клеточного цикла и адаптации к стрессам (Rao et al., 2009). Основным ферментом, обеспечивающим биосинтез полиР у дрожжей, является мембранный белок Vtc4 (Hothorn et al., 2009). Вопрос о том, могут ли клетки *S. cerevisiae*, лишенные полиР синтетазы Vtc4, продуцировать полиР, остается нерешенным из-за различий в методах экстракции полиР. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа (wt) YSC-1048 и мутант Δvtc4 были получены из коллекции Dharmacon. Мы использовали метод экстракции полиР, который позволяет получить отдельные фракции полиР с разной длиной цепи. Сравнение содержания полиР в штаммах *Δvtc4* и wt показало, что фракция короткоцепочечных кислоторастворимых полиР1 уменьшилась в 10 раз, тогда как фракции солерастворимых полиР2 и щелочерастворимых полиР3 с более длинной цепью уменьшились только в 2 раза в клетках *Δvtc4* по сравнению с родительскими клетками. На электрофореграммах фракций полиР1, полиР2 и полиР3выявили характерные полосы, окрашенные толуидиновым синим во фракциях полиР1, полиР2 и полиР3. Согласно ферментативному анализу с помощью очищенной полифосфатазы Ppx1 клетки мутанта *Δvtc4* содержали 10% и 20% кислоторастворимых и кислотонерастворимых полиР от их количества в родительском штамме.

Для решения вопроса о возможной локализации этих полиР выделили препараты митохондрий из клеток родительского и мутантного штаммов, выращенных на глюкозе, т.е. в условиях катаболитной репрессии, когда в норме содержание полиР в митохондриях максимально. В митохондриях мутантного штамма кислоторастворимые полиР отсутствовали, а содержание кислотонерствоpимых полиР составило не более 10% от такового у родительского штамма. Наиболее вероятным является синтез полиР митохондрий VTC комплексом эндоплазматического ретикулюма (Gerasimaitė and Mayer 2016) и доставка в митохондрии посредством везикулярного траффика.

Кривые роста этих двух штаммов в среде с глюкозой не различались, а в среде с этанолом рост мутантный штамм рос хуже (рис. 1). По-видимому, полиР митохондрий, которые в норме расходуются при адаптации к потреблению этанола, необходимы как дополнительный источник энергии в этих условиях.

ПолиР являются важным фактором стрессоустойчивости микроорганизмов. Поэтому мы сравнили чувствительность штаммов wt и *Δvtc4* к стрессовым условиям, вызванным высоким pH, перекисью водорода и токсическими концентрациями солей тяжелых металлов. Штамм *Δvtc4* был более чувствителен к щелочному стрессу, о чем свидетельствует полное прекращение роста в присутствии 60 мМ КОН, тогда как рост штамма wt при этой концентрации подавлялся только на 50%.

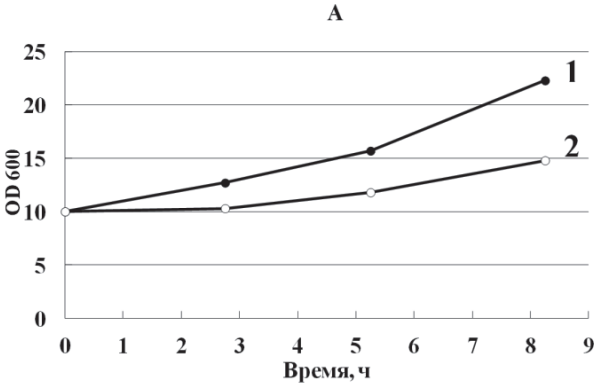



**Рис. 1.** Кривые роста штаммов *S. cerevisiae* после пересева со среды с глюкозой на среду с этанолом: 1 – wt, 2 – Δvtc4

Однако мутантный штамм оказался более устойчивым к $Mn^{2+}$ и перекиси (рис. 2). Устойчивость к марганцевому и окислительному стрессам, наблюдаемая у штамма *Δvtc4*, также характерна для штамма CRN / PPN1, гиперэкспрессирующего Ppn1 и имеющего сниженный уровень полиР (Trilisenko et al., 2019). В клетках штамма CRN / PPN1 в нестрессовых условиях наблюдали активацию транскрипции

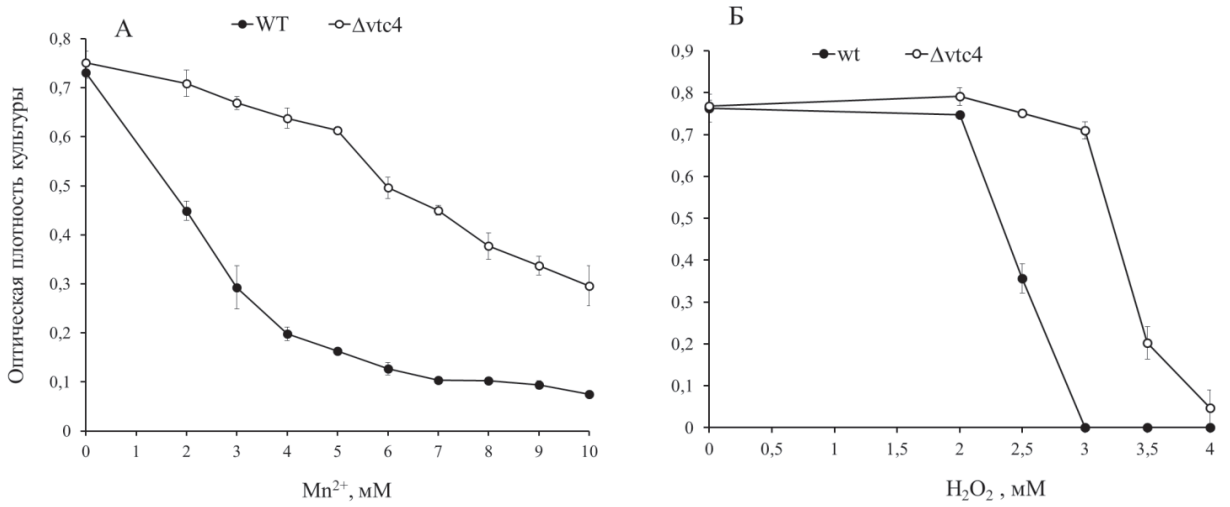



**Рис. 2.** Влияние ионов марганца и перекиси на рост штаммов wt и *Δvtc4*

генов стрессового ответа и подавление экспрессии гена *PHO84.* М.Э. Эльдаровым было показано, что у штамма *Δvtc4* также как у штамма CRN / PPN1, увеличена экспрессия гена *DDR2*, кодирующего фактор мультистрессового ответа, и снижена экспрессия *PHO84*, кодирующего переносчик фосфата и ионов двухвалентных металлов, в том числе марганца. Наблюдаемые транскрипционные эффекты согласуются с повышенной устойчивостью штамма *Δvtc4* к окислительному и марганцевому стрессам. Полученные данные свидетельствуют в пользу возможной триггерной роли полиР в адаптационных процессах у дрожжей.

## Литература


1. *Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A.* (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. Ann. Rev. Biochem.,78, 605–647.
2. *Gerasimaitė R., Mayer A.* (2016) Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles. Biochem. Soc. Trans. 2016, 44 (1), 234–239. https://doi.org/10.1042/BST20150213.
3. *Hothorn M., Neumann H., Lenherr E.D., Wehner M., Rybin V., Hassa P.O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A.G., Herrmann C., Scheffzek K., Mayer A.* (2009) Catalytic core of a membrane-associated eucaryotic polyphosphate polymerase. Science. 324, 513–516.
4. *Trilisenko L., Zvonarev A., Valiakhmetov A., Penin A.A., Eliseeva I.A., Ostroumov V., Kulakovskiy I.V., Kulakovskaya T.* (2019) The reduced level of inorganic polyphosphate mobilizes antioxidant and manganese-resistance systems in *Saccharomyces cerevisiae*. Cells. ;8(5). pii: E461. doi: 10.3390/cells8050461.


# Действие оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на мутанты *Escherichia coli menA* и *ubiC*


*Триандафилова Г.А.[1, 2], Тюленев А.В.[1], Красных О.П.[2], Смирнова Г.А.[1], Октябрьский О.Н.[1]*

[1] Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

[2] ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, Пермь



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37989


Оксопроизводные азотсодержащих гетероциклов рассматриваются в качестве перспективных базовых структур для разработки новых лекарственных препаратов благодаря широкому спектру биоло-

гических активностей, которые проявляют различные представители данного класса, и приемлемым характеристикам с точки зрения медицинской химии. В частности, наблюдается заметный интерес к поиску эффективных туберкулостатиков среди производных 1,4-бензоксазин-2-она [1]. Известно, что некоторые представители данного класса веществ способны блокировать синтез менахинона посредством ингибирования фермента MenB [2]. Также было показано, что ряд кишечных бактерий утратили способность к его биосинтезу и могут использовать менахинон бактерий *E. coli* [3]. Менахинон вместе с убихиноном являются одними из ключевых звеньев дыхательной цепи бактерий. Задачей работы было исследование действия двух оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на мутанты *Escherichia coli menA* и *ubiC*. Для исследования были выбраны два соединения ряда 1,4-бензоксазин-2-она, отличающиеся наличием в заместителе в положении 3 гетероцикла метильного (CBR-386) или третбутильного (CBR-384) радикалов. Ранее было установлено бактериостатическое действие этих соединений на бактерии *E. coli*.

Бактерии выращивали на среде М9 с глюкозой в аэробных условиях, поскольку в предварительных экспериментах с использованием родительского штамма BW25113 (*wt*) было обнаружено, что испытуемые соединения вызывают более сильное ингибирование роста в аэробных, чем в микроаэробных условиях. Для исследования влияния испытуемых соединений на дыхательную цепь бактерий были использованы мутантные штаммы с делециями по менахинону (JW3901) и убихинону (JW5713).

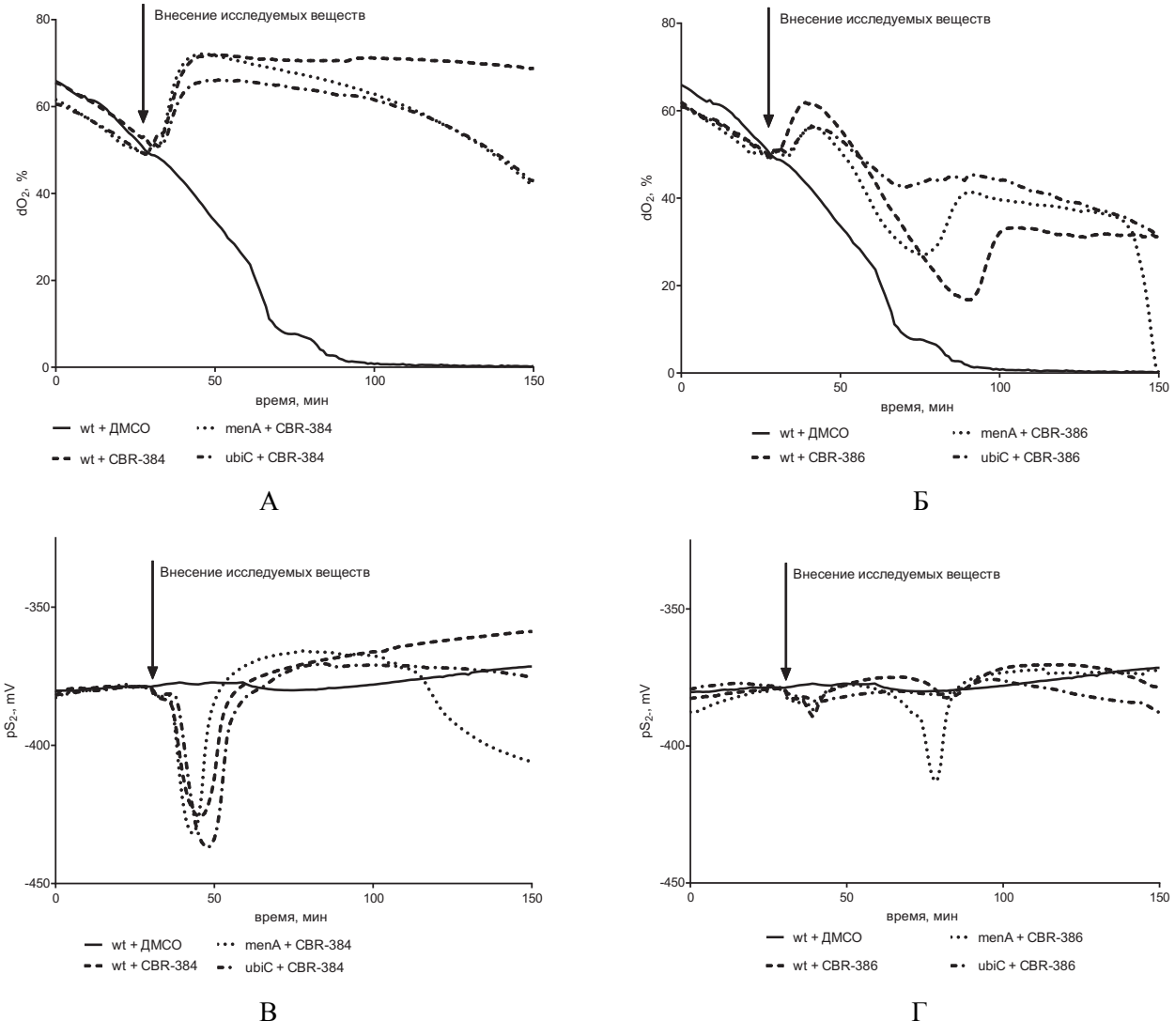



**Рис. 1.** Влияние исследуемых веществ на изменение растворенного кислорода (А, Б) и уровень экстраклеточных сульфид-ионов (В, Г) в культурах мутантов *E. coli menA* и *ubiC*

Наблюдение за изменениями дыхательной активности производили путем измерения содержания растворенного кислорода с использованием электрода Кларка. Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью ион-селективного электрода. Данные параметры измерялись синхронно в реальном времени. Для определения скорости роста в процессе культивирования измеряли оптическую плотность ($OD_{600}$).

Было установлено, что исследуемые вещества оказывали одинаковое действие на рост мутанта *menA* и родительского штамма, тогда как *ubiC* был более устойчив к ингибирующему действию этих соединений.

Данные по измерению уровня растворенного кислорода свидетельствуют о том, что сразу после добавления CBR-384 происходит значительное ингибирование дыхания у всех штаммов. В течение дальнейшей инкубации у мутантов наблюдается заметная активация дыхания (рис. 1А).

При действии CBR-386 на родительский штамм ингибирование дыхания носило двухфазный характер и совпадало по времени с ингибированием скорости роста (рис. 1Б). В этих условиях у мутанта *menA* вторая фазы ингибирования начиналась раньше, чем у родительского штамма. У мутанта *ubiC* вторая фаза ингибирование дыхания была слабо выражена.

При действии CBR-384 на все три штамма наблюдался значительный выброс сульфид-ионов в среду (рис. 1В). CBR-386 индуцировал слабо выраженное двухфазное увеличение экстраклеточного сульфида у родительского штамма и мутанта *ubiC*, в то же время наблюдалось значительное увеличение уровня сульфид-иона на второй фазе у *menA* (рис. 1Г).

Полученные данные свидетельствуют о влиянии исследуемых соединений на продукцию сульфид-ионов и дыхательную активность аэробно растущих бактерий *E. coli.*

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90016.*

## Литература

1. *Zampieri D. et al.* Design, synthesis and antimycobacterial activity of benzoxazinone derivatives and open-ring analogues: Preliminary data and computational analysis // Bioorganic Med. Chem. Lett. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 29, № 17. P. 2468–2474.
2. *Liu N. et al.* Synthesis and SAR studies of 1,4-benzoxazine MenB inhibitors: Novel antibacterial agents against Mycobacterium tuberculosis // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. Vol. 20. P. 6306–6309.
3. *Fenn K. et al.* Quinones are growth factors for the human gut microbiota // Microbiome. 2017. Vol. 5, № 1. P. 161.

# Сайт-направленный мутагенез двухдоменной бактериальной лакказы из *Streptomyces carpinensis*

*Трубицина Л.И.[1], Абдуллатыпов А.В.[2], Трубицин И.В.[1], Лисов А.В.[1], Леонтьевский А.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), lyubov_yurevich@mail.ru
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук)

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37990

Двухдоменные (2д) бактериальные лакказы – полифенолоксидазы, обладающие высокой термостабильностью, а также pH-стабильностью при нейтральных и щелочных значениях pH. Благодаря особенностям организации активного центра, 2д лакказы устойчивы к действию сильных ингибиторов классических трёхдоменных (3д) лакказ: азидов, фторидов, хлоридов. Однако, основное отличие 2д лакказ от 3д лакказ – низкий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП). Ферменты с низким ОВП окисляют более узкий спектр субстратов, поэтому возникает необходимость использовать медиаторы для увеличения окислительной активности 2д лакказ.

Ранее в геноме бактерии *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 был идентифицирован 2д лакказы. Ген был клонирован в экспрессионный вектор pQE-30 и экспрессирован в штамме *Escherichia coli* M15 (pRep4) с высоким выходом (до 150 мг с литра среды). Фермент окислял 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ) при pH 7,5, был термостабилен, и устойчив к действию азида натрия и хлорида натрия при слабощелочных значениях pH. Однако, по сравнению с другими уже исследованными двухдоменными лакказами, для фермента была характерна широкая субстратная специфичность, а также более высокая активность в отношении 2,6-ДМФ. Целью данной работы стало определение окислительно-восстановительного потенциала двухдоменной лакказы, а также поиск детерминант высокой окислительной активности фермента.

Результаты: методом редокс-титрования с использованием редокс-пары феррицианид/ферроцианид было установлено, что ОВП 2д лакказы составил 0,48 V. Таким образом, лакказа из *S. carpinensis* ВКМ Ac-1300 – первый охарактеризованный 2д фермент со средним ОВП. Для того чтобы определить детерминананты среднего ОВП, проведено множественное выравнивание последовательностей 2д лакказ. В качестве потенциальной детерминанты высокой окислительной активности была выбрана позиция His286. Был проведён сайт-направленный мутагенез лакказы и получены мутанты 1300His286Ala и 1300His286Trp. Чтобы определить, как изменилась ли окислительная активность у мутантов, проведён сравнительный анализ кинетических характеристик ферментов в отношении субстратов АБТС и 2,6-ДМФ. Данные представлены в табл. 1.

*Таблица 1*

**Кинетические характеристики лакказ**

| Штамм | $K_{m,}$ мМ | $V_{max,}$ Ед/мг | $k_{kat,}$ $c^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| Дикий тип | АБТС – 0,13<br>2,6-ДМФ – 0,8 | АБТС – 49<br>2,6-ДМФ – 2,1 | АБТС – 24<br>2,6-ДМФ – 0,52 |
| His286Ala | АБТС – 0,16<br>2,6-ДМФ – 0,62 | АБТС – 64<br>2,6-ДМФ – 2 | АБТС – 73<br>2,6-ДМФ – 1,15 |
| His286Trp | АБТС – 0,17<br>2,6-ДМФ – 0,84 | АБТС – 76<br>2,6-ДМФ – 2,52 | АБТС – 67<br>2,6-ДМФ – 1,1 |

Установлено, что замена в позиции 286 приводит к увеличению активности мутантных ферментов в отношении субстратов АБТС и 2,6-ДМФ. Величина $k_{kat}$ мутантов в отношении 2,6-ДМФ возрастала в 2 раза, в то время как $k_{kat}$ мутантов в отношении АБТС возрастала в 2–3 раза, по сравнению с аналогичными значениями у фермента без мутаций. Также ранее проведенное исследование по обесцвечиванию трифенилметановых и азокрасителей указывало на то, что мутанты более эффективно обесцвечивали красители, чем исходный фермент. Таким образом, полученные мутанты превосходили исходный фермент по окислительной активности. Дальнейшие исследования будут направлены на поиск детерминант высокой окислительной активности фермента.

## Real-time мониторинг физиологических параметров аэробно растущих бактерий *Escherichia coli* при пероксидном стрессе

*Тюленев А.В.[1], Смирнова Г.В.[1], Октябрьский О.Н.[1], Габова А.О.[2]*

[1] «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Leksey333@yandex.ru

[2] Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37991

Окислительный стресс (ОС) является результатом воздействия на организмы активных форм кислорода (АФК). Эти активные формы кислорода оказывают токсическое и мутагенное действие на все

виды клеток вследствие окислительного повреждения мембранных липидов, белков и ДНК. В ходе эволюции бактерии, как и другие организмы, выработали механизмы защиты клеток от различных типов окислительного стресса. При воздействии на бактерии *Escherichia coli* пероксида водорода адаптивный ответ связан с индуцированным синтезом большого числа белков, часть которых находится под контролем гена *oxyR*. Предполагается, что ОС может возникать при стрессах, не связанных с прямым воздействием АФК. Было показано, что в аэробных условиях ряд антибиотиков может стимулировать продукцию АФК, которые вносят вклад в бактерицидное действие этих соединений (Kohanski et al., 2007, DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.049). Позднее появились работы другой исследовательской группы, в которых представлены аргументы против АФК-опосредованного киллинга бактерий антибиотиками (Liu, Imlay, 2013, DOI: 10.1126/science.1232751). Следует отметить, что этот случай не единственный пример противоречивых результатов, относящихся к изучению ответа бактерий на стрессы. Источниками расхождений в результатах могут быть такие факторы как использование разных питательных сред, условий культивирования и способов отбора проб, а также отсутствие контроля за изменениями таких физико-химических параметров среды как pH, Eh, содержание кислорода и ионного ионный состав. Одним из способов решения этой проблемы может быть применение разработанной нами системы непрерывной и синхронной регистрации этих и других параметров с применением электрохимических сенсоров непосредственно в колбах с культурами бактерий. Этот комплекс позволяет отследить изменения параметров, происходящие в течение нескольких секунд без отбора биоматериала, непосредственно в бактериальной культуре.

В настоящей работе с помощью электрохимических сенсоров исследовался ранний ответ аэробно растущих бактерий *E. coli* BW25113 на пероксидный стресс, индуцируемый добавлением 2 mM $H_2O_2$ в середине экспоненциальной фазы роста. Бактерии культивировали на среде M9 с 0,15% глюкозы в термостатируемом орбитальном шейкере при 37 ºC.

Real-time мониторинг и регистрацию параметров проводили непосредственно в колбах. Все параметры непрерывно и синхронно обрабатывались в режиме реального времени с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего несколько блоков регистрации. Парциальное давление кислорода ($dO_2$) измеряли электродом Кларка InPro 6800 (Mettler Toledo) на модифицированном контроллере BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., USA). Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного халькогенидного электрода ($pS^{2-}$)XC-$S^{2-}$-001 (Sensor Systems Company, РФ), изменение редокс-потенциала (Eh) регистрировали платиновым электродом ЭРП-105 («Измерительные Технологии», РФ), уровни экстраклеточных ионов калия ($K^+$) регистрировали $K^+$-селективным электродом ELIS-121K («Измерительные Технологии», РФ). Потенциометрические данные с этих электродов обрабатывались цифровыми pX-метрами cpX-2 (ИБП, Пущино, РФ), работающими в синхронизированном режиме. Оптическую плотность и удельную скорость роста определяли традиционным способом.

Добавление 2 mM $H_2O_2$ в бесклеточную среду не оказывало значительного влияния на потенциал электрода Кларка и $K^+$-специфичного сенсора, но несколько повышало базовые значения сульфид-специфичного и платинового электродов.

Сразу после внесения пероксида водорода в растущую культуру, наблюдалось обратимое ингибирование скорости роста, длившееся в течение 30 мин. Одновременно с остановкой роста отмечалось кратковременное резкое увеличение $dO_2$, что связано с деструкцией добавленного пероксида эндогенными пероксидазами с образованием молекулярного кислорода.

Синхронно с изменениями скорости роста наблюдался кратковременный выход ионов $K^+$ из клеток с последующим медленным его поглощением, продолжавшимся в течение 30 мин, что по времени совпадало с периодом возобновления роста. Индукция окислительного стресса пероксидом вызывала резкое падение потенциала сульфид-специфичного сенсора, что указывает на усиление продукции эндогенного сульфида клетками *E. coli*, которое продолжалось в течение 25 мин. Как было показано ранее, это может быть следствием десульфидации избытка цистеина при ингибировании синтеза белка вследствие остановки роста (Smirnova *et al.*, 2019, DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2). В этих условиях Eh среды, резко падал в область отрицательных значений (относительно нового базового уровня). Профиль изменения Eh коррелировал с показаниями сульфид-специфичного электрода.

Применение комплексного подхода с применением электрохимических сенсоров, работающих в режиме real-time, позволило выявить тесную связь между изменениями такими параметрами как удель-

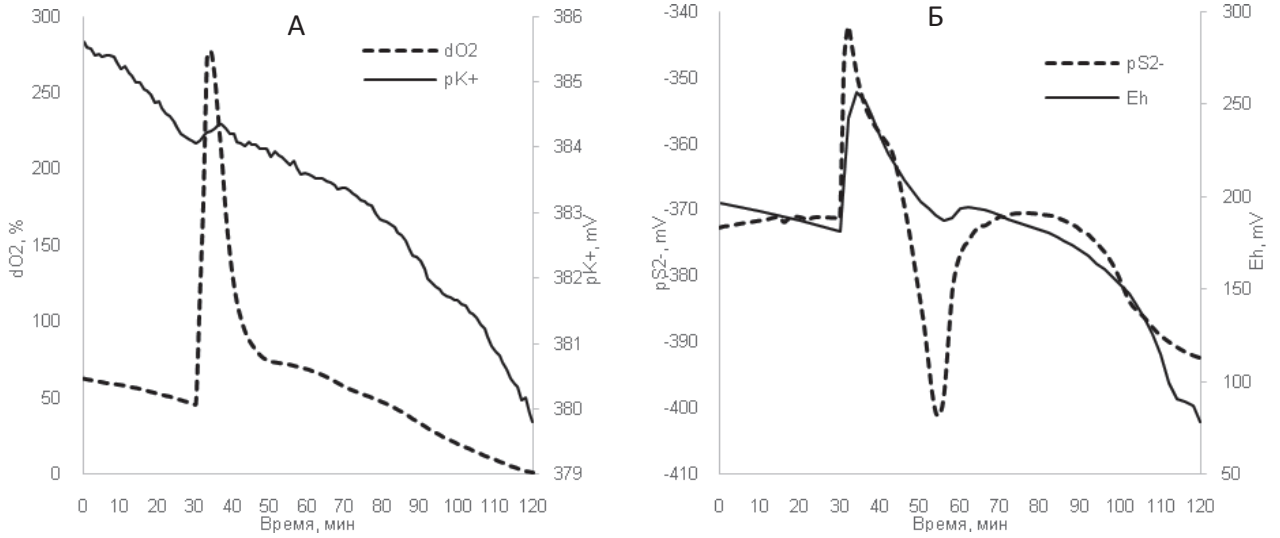



**Рис. 1.** Изменение парциального давления кислорода, экстраклеточного калия (А), продукции эндогенного сульфида и редокс-потенциала среды (Б) при пероксидном стрессе в аэробно растущих культурах *E. coli*

ная скорость роста, продукция эндогенного сульфида и редокс-потенциала культуры при ответе растущих бактерий *E. coli* на пероксидный стресс.

*Работа поддержана грантами РФФИ-Урал № 19-44-590009 и Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.*

## Динамики низкомолекулярных неорганических соединений серы ($SO_3^{2-}$, $H_2S$) в растущих культурах *Bacillus subtilis* при действии антибиотиков (тетрациклин, эритромицин, канамицин)

*Ушаков В.Ю.[1,2], Чурин Г.Ю.[1], Смирнова Г.В.[2], Октябрьский О.Н.[2]*

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», ushakovvad@yandex.ru

[2] Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37992

Известно, что грамположительные бактерии рода *Bacillus* используют в качестве основного низкомолекулярного тиола бацилитиол (BSH) [1, 2], который является функциональным аналогом более изученного глутатиона (GSH), широко распространенного как у грамотрицательных прокариот, так и у эукариот. В состав глутатиона и бацилитиола входит серосодержащая аминокислота цистеин, определяющая высокую редокс-активность этих тиолов. В определенных ситуациях цистеин, взаимодействуя с $Fe^{2+}$ в реакции Фентона, может образовывать высокотоксичные гидроксильные радикалы, поэтому живые клетки строго поддерживают гомеостаз внутриклеточного цистеина [3]. У живых организмов катаболизм цистеина может являться одним из источников $H_2S$ [4]. Одним из промежуточных продуктов в метаболизме цистеина является сульфит ($SO_3^{2-}$). Ранее было обнаружено, что у грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, растущих на глюкозо-минеральной среде, стрессовые воздействия сопровождаются резким увеличением экстраклеточного $H_2S$ и некоторым снижением $SO_3^{2-}$. Список стрессов включает голодание и обработку различными антибиотиками [5].

Цель настоящей работы: проверить динамику $SO_3^{2-}$ и $H_2S$ при обработке растущих клеток *B. subtilis* антибиотиками эритромицином,тетрациклином и канамицином.

Детекцию газообразной формы сульфида водорода проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой бумажными полосками, пропитанными ацетатом свинца. Количественно изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ и интенсивность выражали в процентах. Концентрацию сульфита определяли методом, описанным в источнике [6].

На рис. 1 показана продукция сероводорода при обработке бактерий разными концентрациями тетрациклина в динамике (А) и суммарное выделение $H_2S$ за 60 минут роста в присутствии антибиотика (Б). Достоверное выделение сульфида водорода наблюдалось при экспозиции клеток со всеми исследу-

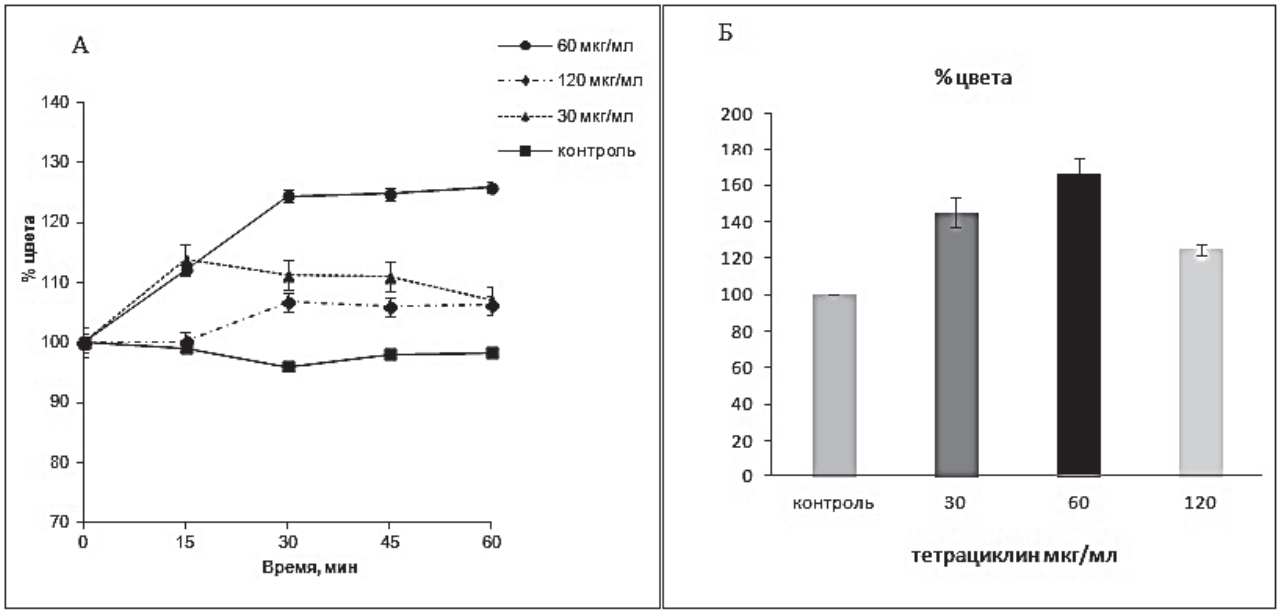



**Рис. 1.** Продукция сероводорода в растущих культурах *B. subtilis* при добавлении тетрациклина. А – изменение продукции $H_2S$ в течение 60 минут. Б – суммарная продукция $H_2S$ за 60 минут. Стрелкой указано добавление антибиотика

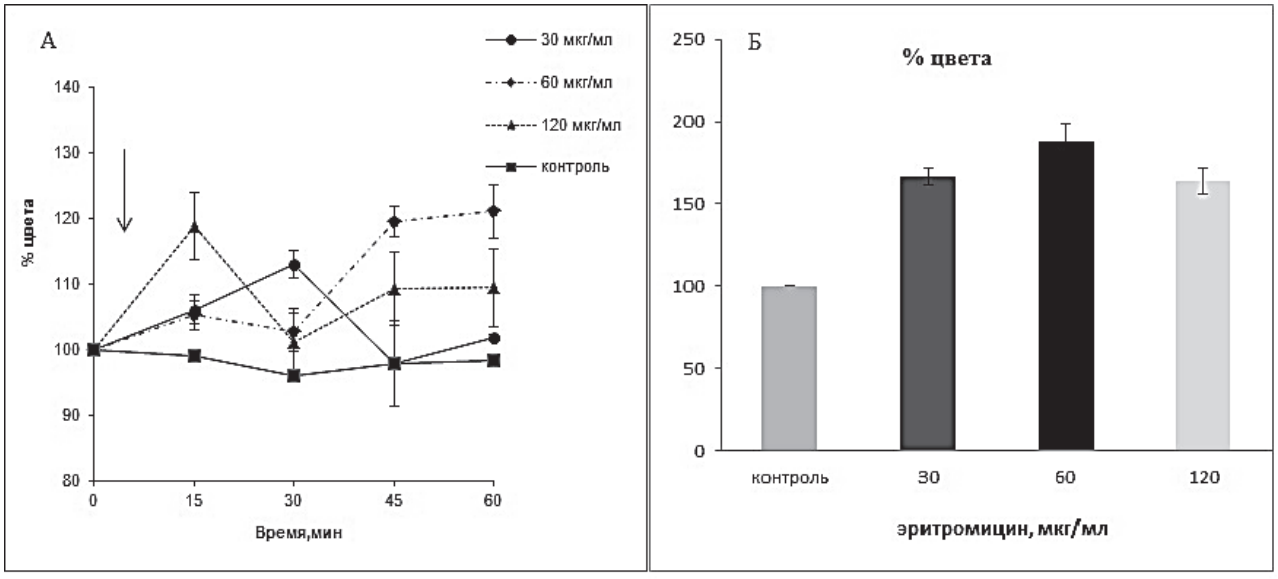



**Рис. 2.** Продукция сероводорода в растущих культурах *B. subtilis* при добавлении эритромицина. А – изменение продукции $H_2S$ в течение 60 минут. Б – суммарная продукция $H_2S$ за 60 минут

емыми концентрациями тетрациклина, но дозозависимого эффекта не регистрировалось. В этих же условиях, при обработке клеток *B. subtilis* 30, 60 и 120 мкг/мл тетрациклина выделение сероводорода повышалось в среднем на 40, 60 и 30%, соответственно, по сравнению с контролем.

После добавления эритромицина была обнаружена корреляция между концентрацией антибиотика и временем максимальной продукции сульфида водорода. Бактерии *B. subtilis* выделяли максимальное количество $H_2S$ на 15, 30 и 60 минуте эксперимента при добавлении 120 мкг/мл, 30 мкг/мл и 60 мкг/мл эритромицина, соответственно (рис. 2).

Обработка бактерий *B. subtilis* канамицином (60 и 120 мкг/мл) приводила к повышению продукции $H_2S$ на 10% по отношению к контролю на фоне сильного бактериостатического действия (не показано).

Первый продукт восстановления сульфатов в клетке, который предшествует образованию сероводорода – это сульфит ($SO_3^{2-}$). Было проведено измерение его концентрации в среде культивирования бактерий *B. subtilis* при нормальном росте и при добавлении исследуемых антибиотиков. За 90 минут культивирования уровень сульфита в контроле повышался на 20% от исходного уровня, в то время как обработка клеток эритромицином, тетрациклином и канамицином приводила к достоверному снижению концентрации сульфита на 35% по отношению к контролю (не показано).

*Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта РФФИ №1 9-04-00888.*

## Литература

1. *Newton G.L., Rawat M., Clair J., Jothivasan V., Budiarto T., Hamilton C., Claiborne A., Helmann J., Fahey R.* Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5(9). – P. 625–627.
2. *Gaballa A., Newton G.L., Antelmann H., Parsonage D., Upton H., Rawat M., Claiborne A., Fahey R.C., Helmann J.D.* Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107(14). – P. 6482–6486.
3. *Park S., Imlay J.A.* High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185(6). – P. 1942–1950.
4. *Mustafa A.K., Gadalla M.M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S.K., Barrow R.K., Yang G., Wang R., Snyder S.H.* $H_2S$ signals through protein S-sulfhydration. // Sci. Signal. – 2009. – V. 2(96):ra 72.
5. *Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N.* Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // Amino Acids. – 2019. – V. 51(10-12). – P. 1577–1592.
6. *Bastiat B., Sauviac L., Picheraux C., Rossignol M., Bruand C. Sinorhizobium meliloti* sigma factors RpoE1 and RpoE4 are activated in stationary phase in response to sulfite // PLOS ONE. – 2012. – V. 7(11). – P. 1–15.

# Делеция гена PHO91, кодирующего переносчик фосфата вакуолярной мембраны, приводит к нарушению способности потреблять метанол клетками метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha*

*Фарофонова В.В.[1], Карагинов А.В.[2], Агафонов М.О.[2], Кулаковская Т.В.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН, alla@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37993

Системы минерального фосфорного обмена у дрожжей вовлечены в регуляторные процессы, связанные с реакцией эукариотической клетки на условия внешней среды, в том числе приводящие к изменениям в энергетическом обмене. Одной из перспективных моделей для изучения этой проблемы являются метилотрофные дрожжи, в частности *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*, в клетках которых

адаптация к потреблению метанола вызывает не только изменения в системах углеродного обмена, но и существенные изменения содержания полифосфатов и ортофосфата по сравнению с культивированием в среде с глюкозой (Andreeva et al., 2018). У дрожжей есть две системы белков-переносчиков фосфата: низкоафинная с относительно низким сродством к субстрату и высокоафинная с более высоким сродством (Austin and Mayer, 2020; Hürlimann et al., 2007; Pinson et al., 2004). У *Saccharomyces cerevisiae* есть три гена, кодирующих низкоаффинные переносчики фосфата, *PHO87*, *PHO90* и *PHO91*. Белки Pho87 и Pho90 локазидованы на плазматической мембране, а Pho91 – на мембране вакуоли. В геноме дрожжей рода *Ogataea* есть только два гена, кодирующих низкоаффинные переносчики фосфата. Один из них, обозначенный *PHO87* (Karginov et al., 2018), кодирует гомолог белков Pho87 и Pho90 *S. cerevisiae*, а второй, не охарактеризованный ранее, – гомолог белка Pho91. В высокоафинную часть системы входят гены *PHO84* и *PHO89*. Кроме функции переносчика, белок Pho87 выполняет функцию сенсора внешнего фосфата и в условиях высокой концентрации этого аниона в среде участвует в подавлении экспрессии генов *PHO84* и *PHO89* (Austin and Mayer, 2020; Hürlimann et al., 2007; Pinson et al., 2004).

Целью данной работы было определить влияние нарушений генов *PHO87* и *PHO91* на способность дрожжей *O. parapolymorpha* потреблять метанол. В качестве контроля, неспособного расти на метаноле, использовали штамм с делецией гена *MOX*, кодирующего метанолоксидазу (фермент, катализирующий первый реакцию пути утилизации метанола).

Инактивация этих генов заметно не повлияла на рост штаммов в среде YPD с глюкозой. Нарушение гена *PHO87* заметно не повлияло на рост штамма на среде с метанолом (данные не приведены), при этом нарушение гена *PHO91* привело к примерно такому же дефекту роста на среде с метанолом, как и нарушение гена *MOX* (таблица). Для определения причины такого подавления роста провели определение активности метанолоксидазы в клетках, инкубированных в среде с метанолом. Эти измерения проводили в образцах лиофилизированной биомассы стандартным методом с ортодианизидином. Так же как у штамма с нарушением гена *MOX*, в клетках штамма с нарушением *PHO91*, активность метанолоксидазы не превышала минимального предела чувствительности метода (таблица). Наблюдаемый рост этих штаммов, по-видимому, обусловлен потреблением аминокислот и других компонентов среды, содержащей пептон и дрожжевой экстракт. Отметим, что на среде, содержащей только эти два компонента, выход биомассы и белка у этих двух мутантных штаммов был таким же, как и при добавлении метанола. Введение в штамм с делецией гена *PHO91* мультикопийной плазмиды с геном *MOX* восстанавливало его рост на среде с метанолом. Неожиданным оказалось то, что инактивация гена *PHO87*, кодирующего низкоаффинный переносчик фосфата плазмалеммы, также восстанавливает способность роста штамма с делецией *PHO91* на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода (таблица). Возможно супрессорный эффект инактивации белка Pho87 объясняется тем, что при отсутствии этого низкоафинного переносчика снимается репрессия генов высокоафинных переносчиков, которые, вероятно, обеспечивают необходимый уровень фосфата в клетках.

*Таблица*

**Накопление биомассы и активность метанолоксидазы (MOX) при росте клеток *O. parapolymorpha* на среде, содержащей метанол в качестве единственного источника углерода**

| Штамм | Генотип* | Биомасса, г/л | Белок мг/л | Активность MOX (Е/мг белка) |
|---|---|---|---|---|
| PHO91-PHO87 (контроль) | *leu2 ade2Δ ura3:: ADE2* {*LEU2*} {*URA3*} | 13±0,2 | 234±1,4 | 1,04±0,013 |
| Δpho91 | *leu2 ade2Δ ura3:: ADE2 pho91::loxP* {*LEU2*} {*URA3*} | 5,0±0,9 | 99±1,0 | 0 |
| Δpho91-multiMOX | *leu2 pho91::loxP* {*URA3*} {*LEU2, MOX*}multi | 14,6±0,1 | 249±0,3 | 0,78±0,08 |
| Δpho91-Δpho87 | *leu2 ade2Δ ura3:: ADE2 pho91::loxP pho87::URA3* {*LEU2*} | 13,4±0,5 | 252±0,9 | 0,81±0,015 |
| ΔMOX | *leu2 mox-Δ* {*LEU2*} | 5,8±0,7 | 87±0,5 | 0 |

* В генотипе приведены только те гены, по которым штаммы могут отличаться друг от друга. В фигурные скобки заключены гены в составе плазмид, интегрированных в неидентифицированные локусы.

Таким образом, установлена взаимосвязь между функционированием компонентов системы гомеостаза фосфата и адаптацией к потреблению метанола у метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha*. Ранее было показано что при росте на метаноле содержание фосфата в клетках этих дрожжей увеличивается втрое по сравнению с ростом на глюкозе (Andreeva et al., 2018). Мы предполагаем, что такая взаимосвязь может быть реализована через участие фосфата в индукции гена *MOX*, либо сборке метанолоксидазы, кроме того, не исключена необходимость фосфата при формировании пероксисом.

## Литература


1. *Andreeva N., Ryazanova L., Zvonarev A., Trilisenko L., Kulakovskaya T., Eldarov M.* Inorganic polyphosphate in methylotrophic yeasts. Appl Microbiol Biotechnol. 2018, 102(12):5235-5244. doi: 10.1007/s00253-018-9008-3.
2. *Austin S., Mayer A.,* 2020. Phosphate Homeostasis − A Vital Metabolic Equilibrium Maintained Through the INPHORS Signaling Pathway. Front Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01367
3. *Hürlimann H.C., Stadler-Waibel M., Werner T.P., Freimoser F.M.,* 2007. Pho91 Is a Vacuolar Phosphate Transporter That Regulates Phosphate and Polyphosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. MBoC 18, 4438–4445. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0457
4. *Karginov A.V., Fokina A.V., Kang H.A., Kalebina T.S., Sabirzyanov T.A., Ter-Avanesyan M.D., Agaphonov M.O.,* 2018 Dissection of differential vanadate sensitivity in two *Ogataea* species links protein glycosylation and phosphate transport regulation. Sci. Rep., 8(1):16428. doi: 10.1038/s41598-018-34888-5.
5. *Pinson B., Merle M., Franconi J.-M., Daignan-Fornier B.,* 2004. Low Affinity Orthophosphate Carriers Regulate PHO Gene Expression Independently of Internal Orthophosphate Concentration in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 279, 35273–35280. https://doi.org/10.1074/jbc.M405398200.


# Конструирование праймеров к генам интереса, кодирующих аквапорины для проведения ПЦР


*Филатов П.В.[1], Калинина А.Е.[1], Кудряшова Т.Р.[1], Крюков А.А.[2], Аронова Е.Б.[1], Юрков А.П.[2]*

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

[2] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, filat200022@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37994


Нехватка воды – один из самых часто встречающихся стрессовых абиотических факторов. Дефицит влаги негативно влияет на растение, нарушая нормальное развитие и рост. Вследствие этого, разработка и оптимизация способов обеспечения устойчивости растений к засухе имеет огромное значение. Одним из наиболее эффективных методов решения данной проблемы в будущем является использование арбускулярной микоризы (АМ). Грибы АМ могут выполнять роль дополнительной корневой системы, а также подавляют экспрессию генов трансмембранных белков аквапоринов, что ограничивает потерю воды клетками растений. Также при подавлении экспрессии генов аквапоринов было обнаружено снижение фотосинтеза при длительном симбиозе, из-за чего ухудшается снабжение органическими веществами, что негативно влияет на отношения с грибами АМ. Однако в настоящее время связь между функцией грибов АМ и работой аквапоринов растения все еще исследуется. В перспективе такие исследования могут пролить свет на ключевые механизмы развития эффективной АМ в условиях засухи или засоления.

В рамках настоящей работы проводится подбор праймеров для целевых генов в пяти семействах аквапоринов (NIP, XIP, SIP, TIP, PIP) активных в симбиозе *M. lupulina* с *R. irregularis* для проведения будущих исследований.


*Научные исследования проводятся при поддержке РФФИ №19-29-05275-МК, а также РФФИ №20-016-00245.*

# Лантан-зависимая регуляция генов метанолдегидрогеназ *Methylorubrum extorquens* DM4

*Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), yulhenbisti@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37995

Аэробные метилотрофные бактерии способны использовать метанол как источник углерода и энергии благодаря наличию метанолдегидрогеназ (МДГ). МДГ грам-отрицательных метилотрофных бактерий окисляют метанол до формальдегида в периплазматическом пространстве с использованием пирролохинолинхинона как кофактора. МДГ содержат ионы $Ca^{2+}$ или $Ln^{3+}$ в активном центре. Наиболее изучен Ca-зависимый фермент – гетеротетрамер, кодируемый генами *mxaFI*. В последнее время активно исследуется новый тип ферментов – XoxF-МДГ, которые 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. Помимо каталитической функции белки XoxF играют важную роль в регуляции экспрессии генов классической MxaFI-МДГ, а также, по-видимому, участвуют в регуляции стресс-ответов бактерий. Активация их экспрессии наблюдалась при росте на специфических токсичных $C_1$-субстратах, таких как дихлорметан [1]. Тем не менее, молекулярные механизмы функционирования XoxF в качестве регуляторов остаются неизученными.

Деструктор дихлорметана *Mr. extorquens* DM4 обладает только одним геном *xoxF* (METD_RS11030) наряду с генами классической MxaFI-МДГ, что делает его удобным модельным объектом для изучения экспрессии с промоторов *mxaF* и *xoxF*. Целью нашей работы было исследование участка промотора гена *xoxF* штамма DM4, отвечающего за лантан-зависимую экспрессию. При выравнивании последовательностей промоторов *xoxF* девяти штаммов *Methylorubrum extorquens* длиной 706 п.н. выявлена полностью идентичная область, включающая 263 п.н. выше стартового кодона, а также более вариабельный участок, в котором у штамма DM4 имелось около 5% нуклеотидных замен. Чтобы проверить функциональность этих участков нами были сконструированы репортерные плазмиды pCM160*gfp*:$P_{xoxS}$ и pCM160*gfp*:$P_{xoxL}$, несущие ген зеленого флуоресцентного белка под контролем участков предполагаемой промоторной последовательности *xoxF Mr. extorquens* DM4 длиной 476 п.н. ($P_{xoxS}$) и 725 п.н. ($P_{xoxL}$) [2]. Аналогично получена репортерная плазмида pCM160*gfp*:$P_{mxa}$ с геном *gfp* под контролем промотора *mxa*-оперона штамма DM4 длиной 318 п.н. Полученные векторы были перенесены в клетки *Mr. extorquens* DM4 дикого типа методом двуродительского скрещивания с использованием штамма *E. coli* S17-1. Трансконъюганты выращивали на жидкой минеральной среде «ММ» с метанолом (0.5%) до $ОП_{600}$ = 0.5.

Установлено, что в клетках репортерного штамма DM4wt pCM160*gfp*:$P_{xoxS}$ в присутствии 1 мкМ $La^{3+}$ происходила индукция GFP, которая наблюдалась не только при использовании метанола, но также формиата, метиламина и дихлорметана. Сравнение активности промоторов разной длины показало, что уровень экспрессии GFP под контролем $P_{xoxL}$ при росте клеток на метаноле с лантаном превышает таковой с $P_{xoxS}$ в 2 раза, а на дихлорметане – более чем в 3 раза (рис. 1). Следовательно, вариабельный участок выше $P_{xoxS}$ содержит энхансер, который при связывании с факторами транскрипции стимулирует экспрессию с промотора гена *xoxF*. Изучение влияния концентраций ионов металлов ($La^{3+}$ и $Ca^{2+}$) на активность промоторов $P_{xoxL}$ и $P_{xoxS}$ у *Mr. extorquens* DM4 продемонстрировало, что уровень экспрессии GFP определялся исключительно концентрацией лантана в среде и не зависел от присутствия кальция даже при его высокой концентрации (150 мкМ). Установлено, что экспрессия с промотора $P_{xoxL}$ начиналась при 2.5 нМ $La^{3+}$ в среде, достигая максимума при 5 мкМ, тогда как наивысшая скорость роста штамма DM4wt pCM160*gfp*:$P_{xoxL}$ отмечалась при 250 нМ $La^{3+}$. Экспрессия с промотора $P_{mxa}$ снижалась при увеличении концентрации лантана в среде, достигая минимального значения также при 5 мкМ $La^{3+}$. Таким образом, для полной активации $P_{xoxL}$ и деактивации $P_{mxa}$ деструктора дихлорметана *Mr. extorquens* DM4

в репортерном векторе требовались несколько более высокие концентрации $La^{3+}$, чем для промоторов близкородственных метилотрофов *Mr. extorquens* PA1 и AM1 [3-4], что может объясняться штаммоспецифичными особенностями и/или разным составом используемых сред. В диапазоне 250 нМ – 5 мкМ $La^{3+}$ репортерные штаммы *Mr. extorquens* DM4 использовали оба типа МДГ одновременно. Точные концентрации, необходимые для хромосомной экспрессии с этих промоторов, могут отличаться, однако эти данные свидетельствуют о существовании диапазона концентраций лантана, в котором клетками используются оба фермента MxaFI и XoxF.

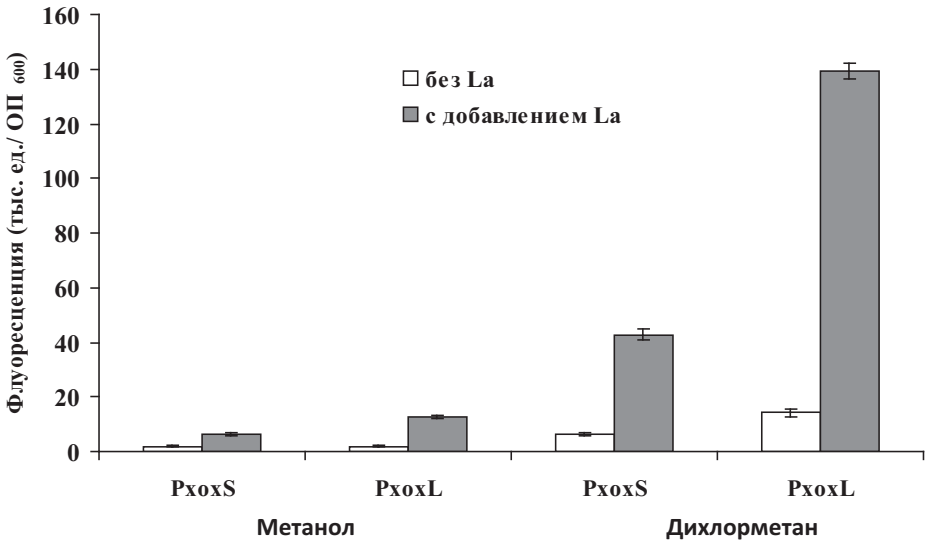



**Рис. 1.** Активность участков промоторов $P_{xoxS}$ и $P_{xoxL}$ Mr. extorquens DM4, выращенных на среде «ММ» с метанолом или дихлорметаном в присутствии 1 мкМ $La^{3+}$ или без него

Таким образом, в результате проведенной работы нами была уточнена длина промоторной последовательности гена *xoxF Mr. extorquens* DM4, обнаружен участок, содержащий энхансер промотора $P_{xox}$, и частично исследована $La^{3+}$-зависимая регуляция генов МДГ указанного метилотрофа. В присутствии лантана XoxF-МДГ функционально заменяют ферменты MxaFI-типа благодаря репрессии генов *mxa*-оперона и активации генов *xox*-оперона.

## Литература


1. *Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л., Троценко Ю.А.* Исследование функциональности гена *xoxF Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 697–704.
2. *Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.* Клонирование промотора гена лантан-зависимой метанолдегидрогеназы *xoxF Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 // Сборник тезисов V Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 3–7 декабря 2018 г.). Москва: Издательство Вода: химия и экология. 2018. С. 161–163.
3. *Ochsner A.M., Hemmerle L., Vonderach T., Nuessli R., Bortfeld-Miller M., Hattendorf B., Vorholt J.A.* Use of rare-earth elements in the phyllosphere colonizer *Methylobacterium extorquens* PA1 // Mol. Microbiol. 2019. V. 111. P. 1152–1166.
4. *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

# Анализ дифференциальной экспрессии генов, вовлеченных в катаболизм дибензотиофена штаммом *Gordonia alkanivorans* 135

*Французова Е.Э.[1,2], Позднякова-Филатова И.Ю.[1], Делеган Я.А.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Пущинский государственный естественно-научный институт,
katkaty235@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37996

Дибензотиофен (ДБТ) – органическое гетероциклическое вещество, которое является типичным серосодержашим компонентом сырой нефти, так как до 70 % серы в ней составляют ДБТ и его замещенные производные. Наличие путей десульфуризации дибензотифена обнаружено у организмов разных родов. Для актинобактерий, включая *Gordonia*, известно, что наиболее распространенным способом усваивания серы из тиофенов является 4S-путь, при котором не происходит разрушения углерод-углеродных связей. Однако ранее нами было выяснено (Delegan et al., 2021), что штамм *G. alkanivorans* 135 в процессе утилизации дибензотиофена использует не гены кластера *dsz*, а другие, ранее неизвестные.

С целью выявления генов, вовлеченных в катаболизм дибензотиофена штаммом 135, был выполнен анализ полного транскриптома. Для этого осуществляли культивирование штамма с различными источниками серы (дибензотиофен или сульфат натрия), в качестве источника углерода использовали глюкозу. Секвенирование РНК выполнено на Illumina Hiseq 2000 (Москва). Сборка транскриптома, анализ и визуализация данных осуществлялась с помощью программ FastQC, Trimmomatic-0.38, Bowtie2, Cufflinks, Cuffdiff, CummeRbund.

Среди всех CDS в геноме штамма *G. alkanivorans* 135 значимое изменение дифференциальной экспрессии (p-value < 0.05) отмечено для 167 генов, 138 из которых имели уровень экспресии в образце с сульфатом натрия ниже, чем в образце с дибензотиофеном (down-regulated гены). С использованием сервиса KEGG данные последовательности были проаннотированы и отнесены к различным функциональным категориям. При этом в категории «Энергетический метаболизм» подкатегория «метаболизм серы» включала 6 генов. В категории «Неклассифицированный метаболизм» найдено 2 ацил-КоА дегидрогеназы, которые как и ген *sfnB* являются родственными гену *dszC*, однако, процент их родства с геном классического *dsz* оперона ДБТ-десульфуризации актинобактерий низкий.

На основании полученных результатов было выбрано 7 генов и с помощью метода RT-qPCR, подтверждено, что гены двух ацил-КоА дегидрогеназ, ген *sfnB* и ген *tauD* таурин диоксигеназы вовлечены в процесс катаболизма дибензотиофена штаммом *G. alkanivorans* 135. Участие указанных генов в процессе катаболизма дибензотиофена, а также использование их актинобактериями в процессе биодесульфуризации ранее в литературе не сообщалось.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-00097).*

## Литература

1. *Delegan Y.* Characterization and genomic analysis of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene-degrading strain / Y. Delegan, Y. Kocharovskaya, E. Frantsuzova, R. Streletskii, A. Vetrova // Biotechnology Reports – 2021.

# Полипептиды HlyII, укороченные с n-конца способны подавлять гемолитическую активность HlyII *B. cereus*

*Хлебалина Н.А.[1,4], Сиунов А.В.[1,4], Нагель А.С.[1], Андреева-Ковалевская Ж.И.[1], Мельник Б.С.[3], Колесников А.С.[1,4], Замятина А.В.[2], Каратовская А.П.[2], Руденко Н.В.[2,4], Борисова М.П.[5], Солонин А.С.[1,4]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино
[2] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, г. Пущино
[3] Институт белка РАН 142290 Московская область, г. Пущино
[4] ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт», Пущино
[5] Институт Теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, solonin.a.s@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37997

Изучение патогенности микроорганизмов является одной из фундаментальных проблем современных микробиологии и медицины. В настоящее время известно, что патогенные бактерии вырабатывают вещества, как непосредственно повреждающие или убивающие клетки и структуры макроорганизма, так и способствующие их проникновению в организм, преодолевая его защитные системы. Эти вещества играют главную роль в развитии заболеваний, вызываемых бактериями. Среди многообразия таких веществ немаловажная роль в патогенезе принадлежит цитолитическим порообразующим токсинам (ПОТ). Эти токсины являются наиболее распространенными бактериальными цитотоксическими белками, которые необходимы для проявления вирулентности разнообразных бактериальных патогенов. Однако, до сих пор нет описания каким образом бактериальная клетка способна защититься от действия собственных ПОТ. При анализе выделенного в *E. coli* рекомбинантного гемолизина II *B. cereus* [1], содержащего на С-конце шестигистидиновый участок с помощью моноклональных антител против С-концевого домена обнаружено наличие укороченных полипептидных фрагментов HlyII [2]. Присутствие зрелого HlyII как во внеклеточной фракции, так и внутри клетки, а также его укороченных с N-конца фрагментов позволило высказать предположение, что эти полипептиды могут участвовать в спасении собственной бактериальной клетки и выступать на определенной стадии ее развития в качестве антитоксина. Генетическое кодирование в бактериях в значительной степени осуществляется через парадигму «один ген–один белок». Тем не менее, особенности структуры мРНК, универсальность генетического кода и динамический характер трансляции иногда позволяют организмам отклоняться от стандартных правил кодирования белка. В частности бактерии и бактериофаги могут использовать несколько нестандартных способов трансляции для экспрессии более одного белка из одного цистрона мРНК [3]. Это обеспечивает более плотную упаковку генетической информации в составе геномов. Одним из таких альтернативных путей является использование дополнительных сайтов инициации трансляции в гене на разных начальных сайтах в пределах одной рамки считывания. Такой тип нетрадиционной стратегии приводит к созданию как минимум двух и возможно более отдельных белков из одного гена, которые имеют идентичные С-концевые структуры, но отличаются по своим N-концевым участкам. Этот сценарий происходит, когда трансляция гена инициируется не только на первичном сайте инициации трансляции, но также на дополнительном, внутреннем сайте инициации трансляции в той же рамке считывания [4]. Белки альтернативного протеома, генерируемые с помощью стратегии «гены в генах», могут выполнять различные важные для бактериальной клетки функции. В случае белка HlyII мы также не можем исключить участия неких специфических протеаз в создании спектра полипептидов. Однако несмотря не неоднозначность в понимании пути образования этих полипептидов мы наблюдаем их присутствие в культуральной жидкости, в дебрисе и в цитоплазме, что может указывать на их функциональную значимость. Один из выявляемых моноклональными антителами природных полипептидов по размеру близок к ранее описанному нами HlyIICTD. Этот домен способен связываться с клеточными и искусственными мембранами, олигомеризоваться в их присутствии и в определенных условиях обра-

зовывать ионные каналы. В данной работе мы представляем данные об участии HlyIICTD в гемолизе эритроцитов кролика и в подавлении его активности в узком диапазоне концентрации HlyII.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592*

## Литература

1. *Baida G. et al.* Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 180, № 1. P. 7–14.
2. *Rudenko N.V. et al.* C-Terminal Domain of Bacillus cereus Hemolysin II Is Able to Interact with Erythrocytes // Russ J Bioorg Chem. 2020. Vol. 46, № 3. P. 321–326.
3. *Shcherbakov D.V., Garber M.B.* 2000. Overlapping genes in bacterial and bacteriophage genomes. Mol Biol (Mosk) 34:572–583. (In Russian.)
4. *Vazquez-Laslop N., Sharma C.M., Mankin A., Buskirk A.R.* Identifying small ORFs in prokaryotes with ribosome profiling. J Bacteriol. 2021 Aug 2:JB0029421. doi: 10.1128/JB.00294-21. Epub ahead of print. PMID: 34339296.

# Изучение роли клеточных нуклеаз в праймированной адаптации в системе CRISPR-Cas I-E

*Цой Ю.[1], Фёдоров И.А.[2], Ширяева А.А.[2], Северинов К.В.[2,3]*

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, innoomen@gmail.com
[2] Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия
[3] Ратгерский Университет, Нью-Джерси, США

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37998

CRISPR-Cas – это системы адаптивного иммунитета бактерий и архей, состоящие из CRISPR-кассет и генов *cas*. CRISPR-кассеты включают в себя уникальные последовательности, спейсеры, расположенные между короткими повторами ДНК. Большинство спейсеров, для которых установлен источник происхождения, приобретены клетками из геномов бактериофагов. Такие спейсеры обеспечивают защиту клетки от вирусной инфекции за счёт расщепления белками Cas участка фагового генома (протоспейсера), комплементарного спейсеру.

В системе CRISPR-Cas I-E *Escherichia coli* узнавание протоспейсера белками Cas приводит к деградации нескольких десятков тысяч нуклеотидов вокруг сайта узнавания. Процесс сопровождается праймированной адаптацией – отбором новых спейсеров из деградировавших участков ДНК и их встраиванием в CRISPR-кассету. Ключевыми белками в процессе адаптации являются белки Cas1 и Cas2. Комплекс белков Cas1-Cas2 связывается с фрагментами ДНК – предшественниками спейсеров – и осуществляет их встраивание в CRISPR-кассету. Участие других белков в адаптации мало изучено. Предполагается, что, связавшись с фрагментом ДНК, комплекс Cas1-Cas2 защищает участок, соответствующий спейсеру, тогда как незащищённые концы процессируются клеточными нуклеазами. В результате формируются зрелые предшественники спейсеров, преспейсеры.

Ранее в нашей группе была разработана экспериментальная система для изучения праймированной адаптации *in vivo* (Shiriaeva et al., 2019). Было установлено, что зрелые преспейсеры, связанные с Cas1-Cas2, представляют собой двуцепочечные фрагменты длиной 33 п.н. с 4-х нуклеотидным выступом на одном из 3’-концов (Musharova et al., 2021). Также было обнаружено, что инактивация 5’-3’ экзонуклеазы RecJ снижает эффективность праймированной адаптации (Kurilovich et al., 2019). Анализ преспейсеров, выделенных из клеток Δ*recJ*, показал снижение их количества и изменение длины 5’-концов. На основе этих данных был сделан вывод об участии RecJ в процессинге 5’-концов преспейсеров.

Поскольку в клетках Δ*recJ* было обнаружено снижение, но не полное подавление адаптации, мы предположили, что функция RecJ частично замещается экзонуклеазой ExoVII, которая обладает 5’-3’ экзо-

нуклеазной активностью. Для проверки данной гипотезы мы инактивировали большую субъединицу ExoVII, кодируемую геном *xseA*, в клетках дикого типа и в штамме Δ*recJ*. Анализ эффективности адаптации с помощью высокопроизводительного секвенирования выявил 10-кратное снижение адаптации в клетках Δ*recJ*, тогда как в клетках Δ*recJ* Δ*xseA* наблюдалось 1000-кратное снижение. Одиночная делеция Δ*xseA* не влияла на уровень адаптации. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о вовлечённости ExoVII в праймированную адаптацию в отсутствии RecJ, предположительно, на этапе образования концов преспейсеров.

Предшествующие исследования *in vitro* показали, что экзонуклеазы ExoT (кодируется геном *rnt*) и DnaQ (кодируется геном *dnaQ*) участвуют в процессинге 3' концов преспейсеров (Kim et al., 2020; Ramachandran et al., 2020). Мы оценили эффект инактивации ExoT и/или DnaQ на встраивание новых спейсеров, эффективность образования и структуру преспейсеров в праймированной адаптации *in vivo*. Полученные результаты убедительно демонстрируют, что ExoT и DnaQ не обязательны для генерации функциональных преспейсеров в праймированной адаптации.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-74-20130).*

## Литература

1. *Kim S. и др.* Selective loading and processing of prespacers for precise CRISPR adaptation // Nature. 2020.
2. *Kurilovich E. и др.* Genome Maintenance Proteins Modulate Autoimmunity Mediated Primed Adaptation by the Escherichia coli Type I-E CRISPR-Cas System // Genes. 2019.
3. *Musharova O. и др.* Prespacers formed during primed adaptation associate with the Cas1-Cas2 adaptation complex and the Cas3 interference nuclease-helicase // PNAS. 2021.
4. *Ramachandran A. и др.* Processing and integration of functionally oriented prespacers in the Escherichia coli CRISPR system depends on bacterial host exonucleases // J. Biol. Chem. 2020.
5. *Shiriaeva A. и др.* Detection of spacer precursors formed in vivo during primed CRISPR adaptation // Nat Commun. 2019.

# Продукция Биоплав и рост нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus Erythropolis* F2 при культивировании на гексадене или глюкозе

*Чайка Н.Я.[1], Ахметов Л.И.[2], Пунтус И.Ф.[1,2] Филонов А.Е.[1,2]*

[1] Тульский государственный университет, Тула,
chayka_nelli@mail.ru
[2] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино,
filonov.andrey@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37999

Поверхностно-активные вещества биологического происхождения (биоПАВ или биосурфактанты) широко применяются в различных областях, включая фармацевтику, пищевую промышленность, биоразложение, косметику и борьбу с вредителями сельского хозяйства. Особый интерес вызывает использование биоПАВ и продуцирующих их микроорганизмов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в составе биопрепаратов. Такие препараты экологически безопасны, эффективны и экономически выгодны. Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны утилизировать широкий спектр органических субстратов, в том числе нефтепродукты, алифатические и ароматические углеводороды. При росте на *н*-алканах родококки продуцируют биоПАВ гликолипидной природы, которые способны снижать поверхностное натяжение и эмульгировать гидрофобные субстраты, повышая их доступность для биодеградации.

Целью настоящей работы являлось изучение поверхностно-активных свойств и кинетики роста нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus erythropolis F2-2* при культивировании на гексадекане или глюкозе.

Штамм *Rhodococcus erythropolis F2-2* выделен из образцов нефтезагрязнённых почв фестивального месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа, обладает способностью роста на нефти, дизельном топливе, различных алканов: гексадекане, додекане, ундекане, и декане в качестве единственных источников углерода. При росте в жидкой среде Эванса с гексадеканом эффективно снижает поверхностное натяжение за счёт продукции биосурфрактантов. Был определён спектр утилизируемых субстратов (ауксанограмма) и антибиотикорезистентность (антибиотикограмма) штамма *Rhodococcus erythropolis F2-2* методом отпечатков и построены кривые роста, а также определены удельная скорость роста, динамика снижения поверхностного натяжения и содержание углеводов в культуре штамма *Rhodococcus erythropolis F2-2* при росте на глюкозе или гексадекане в перерасчёте на трегалозу.

Как видно из данных рис. 1, численность микроорганизмов (КОЕ) достигает максимума к 29 часу роста ($4\times10^8$ КОЕ/мл), при этом значение оптической плотности относительно невелико ($ОП_{600}$ 2) по сравнению с конечными значениями эксперимента ($ОП_{600}$ 10). Следует отметить, что после 29-го часа роста численность микроорганизмов начинает снижаться (фаза отмирания), а оптическая плотность продолжает возрастать, по-видимому, за счёт синтезируемых гликолипидных биосурфактантов.

Трегалолипиды начинают активно синтезироваться после 40 часов культивирования (рис. 1, 2), за счёт этого, по-видимому, увеличивается оптическая плотность до высоких значений ($ОП_{600}$ 7). При этом поверхностное натяжение уже достигает максимальных значений – 29 мН/м (сразу после внесения инокулята оно составляло 43 мН/м).

Сравнение кривых роста штамма *Rodococcus erythropolis F2-2* при культивировании на глюкозе или гексадекане показало, что значения оптической плотности на среде с гексадеканом ($ОП_{600}$10) намного выше, чем значения максимальной оптической плотности на среде с глюкозой ($ОП_{600}$ 1,7). Но, сравнивая со значениями численности бактерий, наблюдаем обратную картину. Численность актиномицетов ($2{,}2\times10^9$ КОЕ/мл) при росте на среде с глюкозой значительно превышает, значения КОЕ при росте с гексадеканом ($3{,}7\times10^8$ КОЕ/мл). Такое расхождение можно объяснить тем, что, несмотря на фазу отмирания, в культуральной жидкости в среде с гексадеканом продолжается накопление биосурфактантов экзо-типа, экскретируемых родококками, что приводит к увеличению оптической плотности.

Штамм *Rodococcus erythropolis F2-2* способен утилизировать н-алканы (декан, ундекан, додекан, гексадекан), а также дизельное топливо и сырую нефть. Он обладает выраженными поверхностно-активными свойствами: продуцирует трегалолипидные биосурфактанты и снижает поверхностное натяжение до 29 мН/м, что соответствует лучшим показателям, описанным в литературе. С учётом перечисленных свойств, исследуемый штамм-нефтедеструктор перспективен для использования в составе биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. По результатам антибиотикограммы установлены селективные маркеры штамма, которые будут использованы при переносе генов

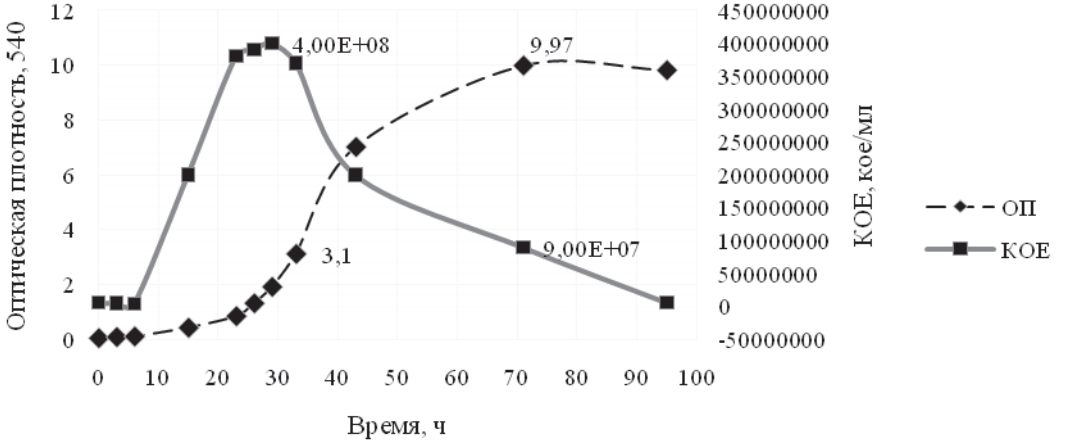



**Рис. 1.** Оптическая плотность и численность культуры штамма *Rhodococcus erythropolis* F2-2 при периодическом культивировании на гексадекане в минерально-солевой среде Эванса при 28 °С, где ОП – оптическая плотность, КОЕ – численность колонеобразующих единиц

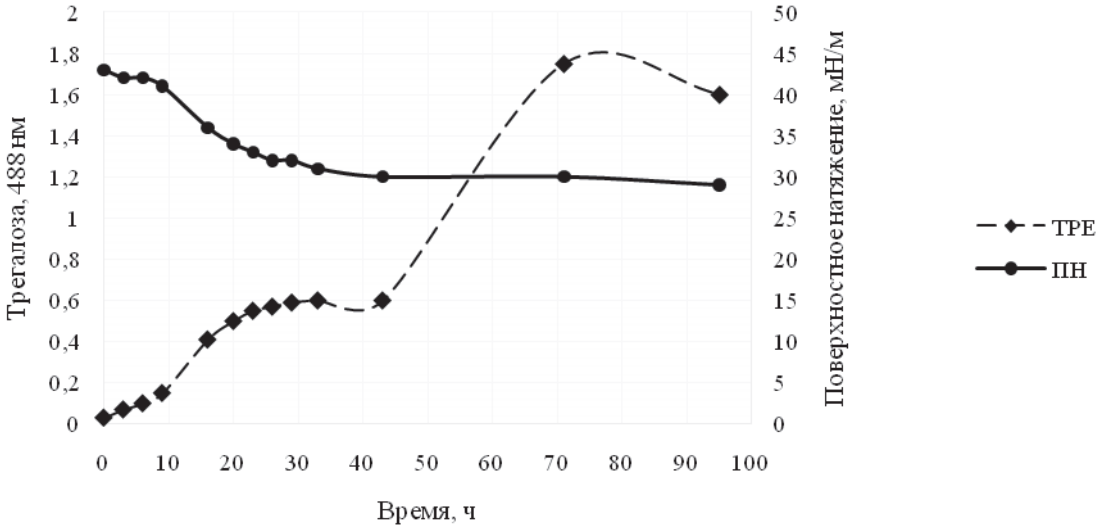



**Рис. 2.** Содержание трегалолипидов и поверхностное натяжение в культурк штамма *Rhodococcus erythropolis* F2-2 при переодическом культивировании на гексадекане в минерально-солевой среде Эванса при 28°С, где ТРЕ – содержание трегалолипидов, ПН – поверхностное натяжение

путём конъюгации или трансформации: маркер для селекции – стрептомицин (50 мкг/мл среды), маркеры для контрселекции – тетрациклин (10 мкг/мл среды), гентамицин (10 мкг/мл среды), канамицин (50 мкг/мл среды). Изученные ростовые параметры штамма *Rodococcus erythropolis F2-2* будут использованы при получении его биомассы для ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирования (транскриптомного анализа) с целью изучения экспресии генов, вовлечённых в синтез биоПАВ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00002 «Особенности синтеза поверхностно-активных соединений бактериями, эффективно утилизирующими нефть при пониженных и повышенных температурах».*

## Секвенирование и анализ генома бактерии *Celeribacter* sp. KMM 6765, выделенной из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*

*Чаусова В.Е., Отставных Н.Ю., Недашковская О.И., Исаева М.П.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, v.chausova@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38000

Род *Celeribacter*, представитель сем. *Rhodobacteraceae* класса *Alphaproteobacteria* филума *Proteobacteria*, был впервые предложен Ivanova et al. (2010), чтобы объединить грамотрицательные, гетеротрофные, аэробные и палочковидные морские бактерии, способные к редукции нитратов в нитриты. *Celeribacter neptunius*, изолированный из пробы морской воды, собранной в Мельбурне (Австралия), является типовым видом рода. Далее был описан новый вид рода, *C. baekdonensis*, изолированный из морской воды у побережья Кореи, и диагноз рода был уточнён благодаря отсутствию нитратредуктазы у типового штамма нового вида, определению состава полярных липидов и нового Г+С состава хромосомной ДНК (Lee et al., 2012). При описании вида *C. indicus*, изолированного из пробы глубоководных донных осадков, род и вид *Huaishuia halophila,* выделенный из морской воды, был реклассифицирован в род *Celeribacter* на основании филогенетического анализа как *C. halophilus* (Lai et al., 2014; Wang et al., 2012). Также, в род *Celeribacter* была включена *Vadicella arenosi* (Romanenko et al., 2011) как *C. arenosi*

на основании анализа геномных последовательностей (Hordt et al., 2020). В настоящее время род *Celeribacter* включает 9 валидно опубликованных видов, которые были изолированы из морской воды, песка, донных осадков и почвы мангровых лесов.

Целью настоящего исследования является характеристика нового штамма КММ 6765, который был изолирован из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, собранной в Охотском море у берегов о. Парамушир (Курильские о-ва). Филогенетический анализ, основанный на секвенировании 16S рРНК гена, показал 98.8% сходства последовательности штамма КММ 6765 с типовым штаммом *Celeribacter marinus* DSM 100036$^{T}$, и 94.8–97.8% с типовыми штаммами остальных представителей рода *Celeribacter*. Для более точного определения таксономического положения штамма *Celeribacter* sp. КММ 6765 было выполнено геномное секвенирование. Черновой геном был получен на платформе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов Nextera DNA Flex kits (Illumina, USA). Сборка прочтений *de novo* осуществлена в контиги с помощью SPAdes 3.15.3, аннотация генома выполнена на сервере RAST. Геном КММ 6765 был собран в 34 контига с N50 равным 297291 п.н., размер генома был оценен в 3504853 п.н. (полнота 99.56%, контаминация 0.15%) и 56.99% ГЦ-состава.

Показатель ANIb между *Celeribacter* sp. КММ 6765 и типовым штаммом *C. marinus* IMCC12053$^{T}$ составил 78.34%. Филогеномный анализ поместил штамм КММ 6765 в род *Celeribacter.* Полученные данные филогенетического анализа и физиолого-биохимических свойств позволяют предположить, что штамм бактерий КММ 6765 представляет новый вид рода *Celeribacter*.

*Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).*

## Литература

1. *Hordt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M., Tindall B.J., Gronow S., Kyrpides N.C., Woyke T., Goker M.* 2020. Front Microbiol 11:468.DOI:10.3389/fmicb.2020.00468.
2. *Ivanova E.P., Webb H., Christen R., Zhukova N.V., Kurilenko V.V., Kalinovskaya N.I., Crawford R.J.* 2010. Int J Syst Evol Microbiol 60:1620–1625. DOI:10.1099/ijs.0.014159-0.
3. *Lai Q., Cao J., Yuan J., Li F., Shao Z.* 2014. Int J Syst Evol Microbiol 64:4160–4167. DOI:10.1099/ijs.0.069039-0.
4. *Lee S.Y., Park S., Oh T.K., Yoon J.H.* 2010 Int J Syst Evol Microbiol 62:1359–1364. DOI:10.1099/ijs.0.032227-0.
5. *Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Mikhailov V.V.* 2011 Curr Microbiol 62:795–801.
6. *Wang H., Zhang X., Yan S., Qi Z., Yu Y., Zhang X.H*. 2012 Int J Syst Evol Microbiol 62:223–228. DOI:10.1099/ijs.0.025536-0.

# СЕКЦИЯ 3

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

## Использование генетических и энологических маркеров при селекции отечественных штаммов дрожжей-сахаромицетов, для адаптации к хересному виноделию

*Авданина Д.А.[1], Кишковская С.А.[2], Танащук Т.Н.[2], Иванова Е.В.[2], Шаламитский М.Ю.[2], Загоруйко В.И.[2], Равин Н.В.[1], Марданов А.В.[1], Эльдаров М.А.[1]*

[1] Институт Биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва,
daria.avdanina@biengi.ac.ru

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», г. Ялта

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38001

Херес или шерри – особая группа креплёных вин, изначально производимых в Испании из различных сортов белого винограда. «Херес» является торговой маркой вина, контролируемой по происхождению регионом Испании – Андалуссии, однако вина такого типа производятся с начала XX в. и в России. Отличительной чертой хересных вин является особый вкусовой букет, что обусловлено явлением хересования – ферментативным окислением этилового спирта в ацетальдегид [1]. Такой специфический вид выдержки вина происходит под дрожжевой плёнкой *S. cerevisiae* [2], называемой флор. Однако остается не совсем понятным, встречаются ли хересные штаммы дрожжей произвольно в природе на диких сортах винограда или они селектируются в производственных условиях.

До недавнего времени в практике отечественного виноделия применялись исключительно классические методы селекции винных штаммов. Неизбежный прогресс в области сравнительной геномики позволяет понять происхождение хересных штаммов, их эволюцию и разработать систему определения генетических маркеров для отбора перспективных штаммов *S. cerevisiae* для хересования [1, 3].

Целью наших исследований был отбор новых природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* для производства вин типа Херес пленочным способом с использованием молекулярно-генетических маркеров в сочетании с энологическими характеристиками. В работе изучались 143 штамма дрожжей рода *Saccharomyces* – 96 природных изолятов, выделенных из образцов винограда в разных климатических зонах Республики Крым и в Ростовской области и 47 штаммов из коллекции микроорганизмов виноделия (КМВ) «Магарач», не рекомендованных для производства хереса.

Генотипирование штаммов по маркерам ITS, FLO11 и YDR379C-Ac проводили по методике, описанной нами ранее [1]. Препараты ДНК получали из лиофильно высушенных дрожжевых клеток, используя смесь фенола с хлороформом по методу, описанному в работе [4]. Для молекулярно-генетической идентификации и отнесения образцов к винным или хересным штаммам дрожжей использовали ме-

тод ПДРФ-анализа ПЦР-фрагментов рДНК, включающих два внутренних транскрибируемых спейсера ITS1 и ITS2 и ген 5,8S рРНК [5]. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазой HaeIII. Для винных штаммов *S. cerevisiae* характерно образование фрагментов размером 311, 230, 172 и 128 п.н.; для хересных – 311, 230, 148 и 129 п.н.

Полиморфизм промотора гена FLO11 (полноразмерный и укороченный, с делецией 111 п.н., варианты), выявляли методом ПЦР с праймерами Flo11D.REV и Flo11D.FOR. Регистрировали образование фрагментов, размером около 400 п.н. или 300 п.н., характерных соответственно для дикого и хересного аллелей гена FLO11 [6]. Для обнаружения штаммов с полиморфными вариантами гена YDR379C-A применяли ПДРФ-анализ ПЦР-фрагментов этого гена, полученных с праймерами F_sdh6 и R_sdh6. Фрагменты, имеющие длину около 800 п.н., обрабатывали рестриктазой AflIII. Выявляли рестрикты размером 450 п.н. и 350 п.н., характерные для хересных аллелей гена YDR379C-A.

Далее отбор штаммов-кандидатов проводился следующим образом – после сортировки образцов по молекулярным маркерам к работе подключились коллеги из ВНИИВиВ «Магарач» для определения энологических свойств в лабораторных условиях (плёнкообразование, органолептический букет, концентрация альдегидов и др.) у культур, имеющих хересный аллель в локусах ITS, YDR379C-A и FLO11 (Табл. 1). Ранее в работе [1] было показано, что исследуемые штаммы незначительно отличаются по бродильной активности и способности к синтезу летучих кислот. Они в оптимальные для виноделия сроки сбродили сахара с образованием 12,5-13,1 об.% спирта.

*Таблица 1*

**Характеристика перспективных штаммов *S. cerevisiae* с тремя хересными локусами (ITS, YDR379C-A и FLO11) по плёнко- и альдегидообразованию в условиях микровиноделия**

| Штамм | Рост плёнки, сут | | Плёнка через 1 мес | Альдегиды, мг/л (M±SEM) | Дегустационная характеристика |
|---|---|---|---|---|---|
| | начало (островки) | окончание (на всей поверхности) | | | |
| I-271 | 9 | 15 | Сплошная, тонкая, эластичная | 426±5,7 | Хересный тон в аромате и вкусе |
| № 3 | 9 | 16 | Тонкая, неоднородная по плотности, с просветами, светло-бежевая | 492,9±7,7 | Слабый хересный тон в аромате и вкусе |
| № 23 | 10 | 16 | Сплошная, однородная, светло-бежевая | 768,0±5,8 | Хересный тон в аромате и вкусе |
| I-329 | 8 | 15 | Сформированная, складчатая, тёмно-бежевая | 506,0±8,8 | Сильный хересный тон в аромате и вкусе |

С учетом энологических характеристик к наиболее перспективным природным штаммам отнесли № 3 (Ростовский район), № 23 (Предгорный район Республики Крым) и I-271 из коллекции ВНИИВиВ «Магарач», которые далее испытывали в условиях микровиноделия. Тестирование проводилось против коллекционного штамма I-329, в настоящее время используемого для производства вина типа Херес. Скорость образования плёнки, ее тип, концентрация альдегидов и дегустационные характеристики испытуемых штаммов были близки к показателям промышленного контрольного штамма, причём количество альдегидов в готовом хересном материале после отбора из-под плёнки не должно быть менее 350 мг/л [7]. Поскольку окислительное брожение при изготовлении хереса должно проходить на виноматериале с содержанием спирта более 16% во избежание развития уксуснокислых бактерий [8], испытуемые штаммы выдерживались на поверхности виноматериала с заданным содержанием спирта. Штаммы № 3 и № 23 снизили ростовую активность, несмотря на хорошее физиологическое состояние. Поэтому для апробации в производственных условиях был выбран более устойчивый коллекционный штамм I-271. В результате проведённого скрининга по генетическим, энологическим и химическим характеристикам штамм I-271 рекомендован для хересования виноматериалов из сорта винограда Алиготе, а также купажных виноматериалов сортов Ркацители и Совиньон зелёный [4].

В представляемой работе показан современный научный подход к скринингу изолятов *S. cerevisiae* по генетическим маркерам ITS, YDR379C-A и FLO11, что позволяет быстро и достоверно выявлять штаммы, наиболее перспективные для технологии производства хересных вин.

## Литература

1. *Kishkovskaya S.A.; Tanashchuk T.N.; Shalamitskiy M.Y.; Zagoryiko V.I.; Shiryaev M.I.; Avdanina D.A.; Eldarov M.A.; Ravin N.V.; Mardanov A.V.* Natural Yeast Strains of Saccharomyces cerevisiae that are Promising for Sherry Production. Appl. Biochem. Microbiol. 2020, 56, 329–335, doi:10.1134/S0003683820030060.
2. The Yeasts: A Taxonomic Study; Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., Ed.; 5th ed.; Kindle Edition, 2011; ISBN 978-0444521491.
3. *El'darov M.A.; Avdanina D.A.; Shalamitskii M.Y.; Ivanova E.V.; Tanashchuk T.N.; Kishkovskaya S.A.; Ravin N.V.; Mardanov A.V.* Polymorphism of the Iron Homeostasis Genes and Iron Sensitivity in Saccharomyces cerevisiae Flor and Wine Strains. Microbiol. (Russian Fed. 2019, 88, 200–205, doi:10.1134/S0026261719020036.
4. *Kishkovskaia S.A.; Tanashchuk T.N.; Avdanina D.A.; Eldarov M.A.; Ivanova E.V.; Shalamitskiy M.Y.; Zagoruiko V.I.; Ravin N.V.; Mardanov A.V.* Screening for promising yeast strains for sherry wine production using genetic and enological markers. Sel'skokhozyaistvennaya Biol. 2021, 56, 537–548, doi:10.15389/AGROBIOLOGY.2021.3.537ENG.
5. *Charpentier C.; Colin A.; Alais A.; Legras J.L.* French Jura flor yeasts: Genotype and technological diversity. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 2009, 95, 263–273, doi:10.1007/s10482-009-9309-8.
6. *Fidalgo M.; Barrales R.R.; Ibeas J.I.; Jimenez J.* Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006, 103, 11228–11233, doi:10.1073/PNAS.0601713103.
7. *Валуйко Г.Г.* Технология виноградных вин; Валуйко, Г.Г., Ed.; Симферополь, 2001; ISBN 966-584-186-6.
8. *Саенко Н.Ф.* Вино херес и технология его производства; Картя Молд.; Кишинёв, 1975;


# Биотехнологический потенциал бактерий, выделенных из биотопов района промышленных солеразработок Верхнекамского соленосного бассейна


*Ананьина Л.Н.[1], Шестакова Е.А.[1], Горбунов А.А.[2]*

[1] Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь,
ludaananyina@mail.ru

[2] Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38002


Промышленная разработка Верхнекамского соленосного бассейна (ВСБ) сопровождается изменением природного ландшафта и физико-химических характеристик биотопов, а, в частности, увеличением концентрации водорастворимых солей (Бабошко, Бачурин, 2009). Из литературных источников известно, что увеличение солености среды приводит к доминированию в сообществах автохтонных микроорганизмов галотолерантных и галофильных бактерий. Бактерии этих физиологических групп могут являться источниками гидролитических ферментов (амилаз, протеаз и липаз), сохраняющих стабильность и активность в широких пределах солености, значений pH и температуры, и, следовательно, подходить для производственных процессов в специфических физических и химических условиях. Другое перспективное направление использования солеустойчивых бактерий – в качестве продуцентов низкомолекулярных органических соединений осмолитов (совместимые вещества), например, эктоина. В настоящее время эктоин широко используется в производстве средств по уходу за кожей (Lentzen et al., 2006).

*Целью исследования* было проведение скрининга выделенных из биотопов промышленных разработок ВСБ бактерий по способности к продукции гидролитических ферментов, накоплению эктоина и его гидроксипроизводного.

Скрининг на гидролитические ферменты (амилазу, желатиназу, липазу (на примере Tween 60 и 80)) проводили согласно (Методы общей бактериологии, 1983). В качестве среды культивирования исполь-

зовали полноценную среду Раймонда (Плотникова и др., 2011), содержащую (г/л минеральной среды Раймонда): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2,5, NaCl – 30, агар – 15. Культивирование бактерий проводили при температуре 28°С.

Для исследования совместимых веществ бактериальную культуру выращивали в минеральной среде Раймонда, содержащей 5% NaCl и глюкозу (1 г/л) при 28 °С. Экстракцию органических соединений из клеток и последующий анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Shimadzu prominence LC-20AD (Shimadzu corporation, Япония), снабженном UV/VIS-детектором CPD-20A (Shimadzu corporation, Япония), на колонке Сепарон SGX 100 $NH_2$, 4,6×150 мм, 5 мкм (Dr. Maisch GmbH, Германия) проводили согласно методикам, описанным Schubert et al., 2007. Идентификацию соединений проводили при сравнении времени удерживания с коммерческими препаратами эктоина и гидроксиэктоина (Fluka, Германия). Дополнительно состав этанольных экстрактов клеток исследовали методом спектроскопии ЯМР $^1H$ на приборе Bruker Avance Neo 400 (Bruker Corporation, США), используя в качестве внутреннего стандарта трет-бутиловый спирт. Отнесение сигналов в спектре проводили сравнением с сигналами аутентичных образцов (эктоина и гидроксиэктоина).

Всего в скрининг было включено 28 штаммов различных таксономических групп, выделенных из биотопов района солеразработок ВСБ, и хранящихся в коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН». Показано, что гидролитической активностью обладало 57,15% исследованных бактерий. Наиболее часто среди исследованных штаммов встречалась гидролитическая активность в отношении крахмала. Ее проявили 11 штаммов. Способностью к гидролизу желатина обладали 4 штамма. Протеазная активность обнаружена у представителей родов *Bacillus, Brevibacterium* и *Arthrobacter*. Липазная активность обнаружена у 3 штаммов рода *Rhodococcus*. Некоторые из изученных культур характеризовались способностью к гидролизу как желатина, так и крахмала.

Исследованные штаммы, обладающие гидролитической активностью, были проверены на способность накапливать в ответ на осмотический стресс эктоин и гидроксиэктоин. Установлено, что изученные штаммы отличались способностью накапливать данные осмопротекторы. Так, культивирование штамма *Brevibacterium* sp. U1 в присутствии 5% хлорида натрия приводило к накоплению эктоина. У штаммов рода *Rhodococcus* в экстрактах клеток были обнаружены как эктоин, так и гидроксиэктоин. В то время как в клетках штамма *Arthrobacter* sp. SMB32 эктоин был обнаружен в следовых количествах. Наиболее высокое внутриклеточное количество эктоина (0,45 мкмоль/мг сухого веса) накапливал штамм *Brevibacterium* sp. U1. Методом ЯМР было установлено, что эктоин являлся преобладающим соединением в экстрактах из клеток штамма *Brevibacterium* sp. U1.

Таким образом, выявлены солеустойчивые штаммы-продуценты гидролитических ферментов и эктоина, перспективные для использования в биотехнологических процессах.

*Настоящее исследование было выполнено при финансовой поддержке государственного задания АААА-А19-119112290008-4.*

## Литература

1. *Бабошко А.Ю., Бачурин Б.А.* Тяжелые металлы в отходах калийной промышленности // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). 2009. № 5. С. 369–376.
2. *Lentzen G., Schwarz T.* Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. // Appl. Microbiol Biotechnol. 2006. Vol. 72, № 4. P. 623–634.
3. Методы общей бактериологии / Пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардт и др. – М.: Мир, 1983. – Т. 1, 2, 3.
4. *Plotnikova E.G., Anan'ina L.N., Krauzova V.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Lebedev A.T., Demakov V.A., Evtushenko L.I. Thalassospira permensis* sp. nov., a novel halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium // Микробиология. № 5. 2011, p. 691–699.
5. *Schubert T., Maskow T., Benndorf D., Harms H., Breuer U.* Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. P. 3343–3347.

# Характеристика новых бактериальных штаммов, способных к биоконтролю фитопатогенных микроорганизмов

*Анохина Т.О., Есикова Т.З., Абашина Т.Н., Соляникова И.П.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино,
to_anohina@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38003

Повсеместное применение химических средств защиты растений приводит к ряду негативных последствий, таких как накопление токсичных соединений в почве, водных экосистемах и растениях и распространение резистентных к пестицидам фитопатогенных микроорганизмов. Для защиты растений от возбудителей болезней все шире применяются биологические препараты, основой которых являются разнообразные микроорганизмы и их метаболиты. Положительными сторонами использования биопрепаратов являются их экологичность, возможность чередования с химическими средствами защиты растений и достаточно высокая эффективность. Особое внимание уделяется полифункциональным штаммам микроорганизмов, сочетающим фитостимулирующие свойства и способность к биодеградации органических поллютантов. Целью данной работы было выделение и характеристика новых бактериальных штаммов, обладающих комплексным технологически значимым потенциалом, включающим в себя наличие антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микроорганизмам и способность к разложению токсичных органических соединений.

В работе исследовали бактериальные штаммы, выделенные из почв центрально-черноземного района России прямым высевом на агаризованную минеральную среду М9, содержащую бензоат натрия (200 мг/л) как единственный источник углерода и энергии. Бактерии далее культивировали на среде LB при 28 °С; для выращивания грибов использовали среду Каннера. Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование генов 16S рРНК и филогенетический анализ проводили общепринятыми методами.

В качестве тест-культур для изучения антагонистической активности были использованы штаммы фитопатогенных грибов *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium graminearum, Rhizoctonia solani* и бактерий *Pseudomonas savastanoi* ВКМ В-1546, *Pantoea agglomerans* ATCC 27155$^{T}$, *Ralstonia* sp. 7-1, *Pectobacterium carotovorum* subsp. c*arotovorum* ВКМ В-1247Т, *P. wasabiae* В15, *Xanthomonas campestris* ВКМ В-610, *X. campestris* ВКМ В-570, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90RK), *A. tumefaciens* СВЕ21, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ВКМ Ас-1403. Определение антагонистической активности проводили при совместном культивировании исследуемых штаммов и фитопатогенных микроорганизмов.

Методом прямых высевов было выделено 30 штаммов бактерий-деструкторов бензоата, различающихся по морфологии колоний. Все изоляты были протестированы на наличие антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium graminearum* и *Rhizoctonia solani*. Было выявлено, что только 4 штамма (обозначенные как 3, 18, 27, 28) проявляли антигрибную активность. Наибольшую активность по отношению ко всем используемым штаммам фитопатогенных грибов имел штамм 3, тогда как бактерии 27, 28 и 18 подавляли рост только *F. graminearum*.

Отобранные штаммы были исследованы на способность ингибировать рост фитопатогенных бактерий, которые относятся к наиболее опасным возбудителям инфекционных болезней растений (табл. 1). Наибольшей антибактериальной активностью характеризовался штамм 3, который эффективно подавлял 9 из 10 тест-бактерий. Штаммы 18 и 27 характеризовались средней антибактериальной активностью, наиболее эффективно они ингибировали рост *P. carotovorum* ВКМ В-1247Т и *P. wasabiae* В15. Штамм 28 подавлял только рост штаммов *A. tumefaciens*. Ни один из штаммов не был активен против *Pantoea agglomerans* ATCC 27155$^{T}$.

*Таблица 1*

**Антибактериальная активность почвенных штаммов**

| Тест-бактерия | Диаметр зоны подавления, мм | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *P. chlororaphis* 3 | *B. subtilis* 18 | *B. subtilis* 27 | *B. subtilis* 28 |
| *Pseudomonas savastanoi* B-1546 | 16±2 [1] | 14±1 | 14±1 | – |
| *Pantoea agglomerans* ATCC 27155$^T$ | – [2] | – | – | – |
| *Ralstonia* sp. 7-1 | 26±3 | 14±1 | 14±1 | – |
| *Pectobacterium carotovorum* B-1247$^T$ | 16±2 | 18±2 | 18±2 | – |
| *Pectobacterium wasabiae* B15 | 15±2 | 18±2 | 18±2 | – |
| *Xanthomonas campestris* B-610 | 16±1 | – | – | – |
| *Xanthomonas campestris* B-570 | 16±2 | 14±1 | 14±1 | – |
| *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90RK) | 18±2 | 12±1 | 16±2 | 16±2 |
| *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 | 26±3 | 12±1 | 12±1 | 12±1 |
| *Clavibacter michiganensis* Ac-1403 | 16±1 | – | – | – |

[1] В таблице приведены среднее значение ± стандартное отклонение. Данные получены в результате трех независимых экспериментов.

[2] Зона подавления тест-бактерии отсутствует.

По результатам филогенетического анализа штаммы 27, 28 и 18 были идентифицированы как представители класса *Bacceliaceae*, рода *Bacillus*. Данные изоляты показали высокий уровень сходства (99,4%) с типовым штаммом этого вида *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10$^T$. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 3 показал, что он относится к классу *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*, к виду *P. chlororaphis* и имеет высокий уровень сходства (~99,6%) с типовым штаммом *P. chlororaphis* DSM 50083$^T$.

Далее выделенные бактерии проверяли на способность утилизировать различные ароматические, алифатические и хлорсодержащие соединения: капролактам, салицилат, гентизат, протокатехоат, *орто*-фталат, глифосат, фенол, хлорбензоаты (2-, 3-, 4-хлорбензоат), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), 2,4,6-трихлорфенол, бензол, толуол, этилбензол, *пара*-ксилол, гексан, октан, гексадекан, дизельное топливо. Оказалось, что, помимо бензойной кислоты, исследуемые штаммы утилизировали другие ароматические карбоновые кислоты – салициловую (*B. subtilis* 18, 27, 28), протокатеховую (*P. chlororaphis* 3) и *орто*-фталевую (*B. subtilis* 27, 28), а также такие токсичные соединения как *пара*-ксилол, гексадекан, дизельное топливо (*B. subtilis* 27, 28), капролактам (*B. subtilis* 18, 27, 28). Штамм *P. chlororaphis* 3 рос на среде с глифосатом (системный гербицид) как единственном источнике фосфора.

Таким образом, получены и охарактеризованы биотехнологически значимые штаммы бактерий, совмещающие в себе свойства подавлять фитопатогенные микроорганизмы и разлагать токсичные органические поллютанты.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-54-80003).*

# Меллеолиды грибов комплекса *Armillaria mellea* sensu lato (s. l.), выделенных в Сибири и Крыму

*Антипова Т.В.[1], Желифонова В.П.[1], Литовка Ю.А.[2,3], Павлов И.Н.[2,3], Баскунов Б.П.[1], Маколова П.В.[2,3], Тимофеев А.А.[2], Козловский А.Г.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
tatantip@rambler.ru
[2] Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
[3] Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

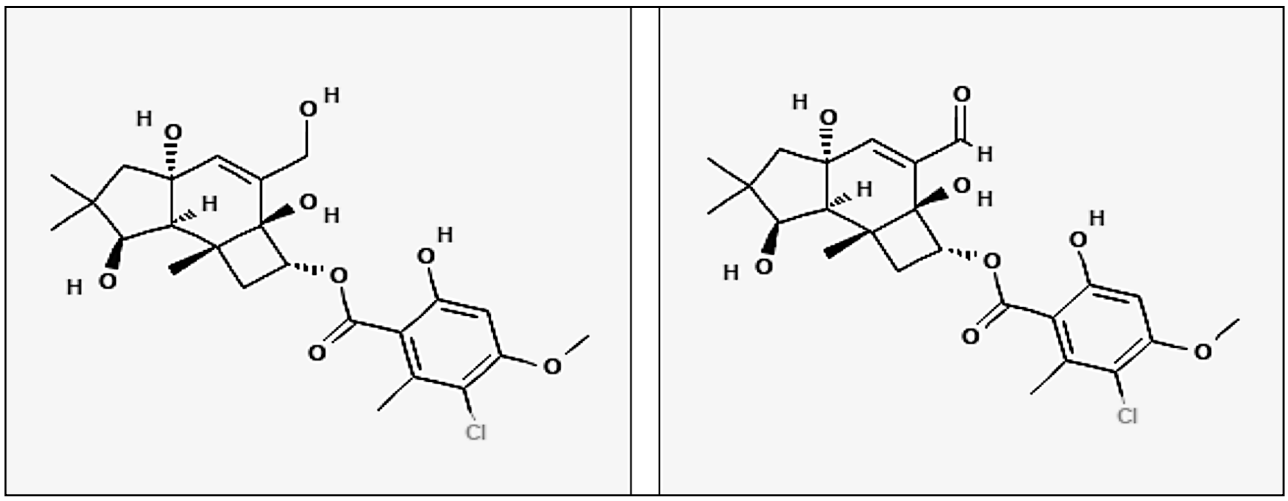
DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38004

Комплекс грибов *Armillaria mellea* sensu lato (**s. l.**) поражает сотни видов хвойных и лиственных пород деревьев в различных климатических зонах по всему миру (Baumgartner et al., 2011). *Armillaria* колонизирует живые корни, вызывает некротические изменения в растительной ткани, а затем использует мертвую ткань в качестве источника питания. Комплекс *A. mellea* s.l. насчитывает свыше 40 видов, которые существенно различаются по вирулентности. Встречаются возбудители массового усыхания лесных древостоев (*A. solidipes*; *A. mellea; A.sinapina*), слабые патогены, развивающиеся на сильно ослабленных деревьях (*A. gallica)*, а также преимущественно сапротрофы, колонизирующие мертвую древесину (*A. cepistipes*). Исследования в области физиологии *Armillaria* в первую очередь связаны с изучением ферментов, разлагающих биополимеры древесины (целлюлаза, лакказа, пероксидаза) и вторичных метаболитов. Роль вторичных метаболитов *Armillaria* в их жизненном цикле в настоящее время активно изучается. Сесквитерпеновые арильные эфиры (меллеолиды) составляют основную группу вторичных метаболитов этих грибов. В настоящее время известно более 70 структур меллеолидов, которые принадлежат к одному из самых больших классов природных соединений (Dorfer et al., 2019). Несколько соединений, обнаруженных у *A. mellea*, включая армилларикин, армилларидин, арнамиал и др., обладают противоопухолевым цитотоксическим действием. Для многих меллеолидов показана противомикробная активность и антиоксидантные свойства. В зависимости от положения двойных связей и функциональных групп в молекулах меллеолидов, соединения проявляют различную антифунгальную активность. Фитотоксигенная активность разных меллеолидов была показана на каллусной культуре *Picea abies* и листьях салата.

Целью работы было исследование вторичных метаболитов грибов комплекса *A. mellea* s. l., выделенных в Сибири и в Крыму и исследование их фитотоксичности *in vitro*. Объектами исследования служили 18 штаммов грибов рода *Armillaria*. Штаммы были изолированы в 2009–2018 гг. на территории Сибири (п-ов Таймыр, юг Красноярского края, Республика Тыва, Республика Хакасия), Дальнего Востока (Сихотэ-Алинь) и Крыма из пораженных *Armillaria* хвойных (*Abies sibirica* и *Picea jezoensis*) и лиственных растений (*Alnus Mill, Betula pendula, Carpinus betulus, Pyrus L., Quercus petraea, Salix*). Видовая идентификация была установлена в результате скрещивания моноспоровых культур с тестерами европейских и китайских видов, была подтверждена секвенированием участков генетических маркеров ITS-1, IGS-1 и TEF-lα. Исследуемые изоляты были сгруппированы в шесть клад, соответствующих известным видам с высоким уровнем статистической поддержки: четыре изолята сгруппированы в кладу *A. borealis* Marxmüller & Korhonen, пять – в *A. cepistipes* Velenovský, три – в кладу *A. gallica* Marxm.; три – в кладу *A. sinapina* Bérubé & Dessur; два – в *A. mellea* (Vahl) P. Kummer; один – в кладу *A. ostoyae* (Romagn.) Herink). Все штаммы являлись продуцентами трициклических сесквитерпеновых арильных эфиров (меллеолидов). Было идентифицировано 15 различных соединений. У всех изученных штаммов в спектре присутствовали меллеолид D и мелледонал C (рис.).

Эти соединения содержат атом хлора при C-6′ орселинового кольца, но различаются наличием спиртовой или альдегидной групп при C-1 протоиллуденового кольца соответственно.

Состав других меллеолидов варьировал в зависимости от штамма. Можно отметить присутствие определенных меллеолидов у штаммов одного вида. Так, кроме меллеолида D и мелледонала C, все иссле-



Меллеолид D

Мелледонал C

**Рис.** Структуры меллеолидов

дованные штаммы вида *A. borealis* (Южная Сибирь; *A. sibirica, B. pendula*) образовывали меллеолид B. Три штамма *A. borealis* синтезировали его хлорпроизводное мелледонал B (эти соединения преобладали в метаболоме этих грибов) и мелледонол. В двух из четырех исследованных штаммов *A. borealis* идентифицировали мелледонал C, 5′-O-метоксимелледонал и мелледонал. В профиле метаболома *A. cepistipes* (Южная Сибирь; *B. pendula* и *A. sibirica*) преобладал меллеолид D; мелледонал C и менее распространенный меллеолид C также были идентифицированы во всех исследованных штаммах. Все штаммы *A. sinapina*, кроме меллеолида D и мелледонала C, образовывали 5′-O-метилмелледонал и меллеолид B. Меллелиод H и 13-гидрокси-5′-O-метилмеледонал были обнаружены только у штаммов этого вида. У двух исследованных штаммов *A. gallica* были обнаружены мелледонал B, меллеолид C, мелледонал и редкие меллеолиды L и M. Остальные мелледоналы были обнаружены у единичных штаммов разных видов. По-видимому, биосинтез меллеолидов имеет штаммовые отличия, связанные с географическим местом, с различным климатом и растением-хозяином. Изучение продукции меллеолидов сибирскими штаммами *Armillaria* показало, что их максимальное накопление в среде варьировало от 2 до 239 мг/л. Наиболее активными продуцентами меллеолидов были *A. borealis* 435*, A. gallica* Cr3-17 и *A. mellea* Cr2-17, которые накапливали меллеолиды в количестве 188, 196 и 239 мг/л соответственно. Эти штаммы представляют интерес для биотехнологии, в качестве продуцентов биологически активных соединений. Изучение влияния смеси меллеолида D и мелледонала C на каллусную культуру тополя *P. alba* и проростки хвойных растений *P. sylvestris* и *L. sibirica* показало их фитотоксичное действие. Это позволяет рассматривать синтез меллеолидов грибами *Armillaria* как один из возможных механизмов патогенности, играющих важную роль в усыхании древостоя.

## Литература


1. *Baumgartner K., Coetzee M.P., Hoffmeister D.* (2011). Molecular Plant Pathology 12(6): 515–534. – doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00693.x
2. *Dorfer M., Gressler M., Hoffmeister D.* (2019). Mycological Progress 18: 1027–1037. – doi: 10.1007/s11557-019-01508-z

# Мицелиальные актинобактерии как потенциальные биодеструкторы углеводородов нефти

*Бабич Т.Л.[1], Грачёва Т.А.[2], Зотова А.Н.[2]*

[1] Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
[2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38005

Для увеличения рентабельности нефтяных месторождений, находящихся на последней стадии эксплуатации, широкое распространение получили микробиологические методы повышения нефтеотдачи. Такие биотехнологии основаны на внесении в пласт извне соответствующих поставленным задачам микроорганизмов или их метаболитов, или на активации подземной микрофлоры. Также активно ведутся поиски угловодородокисляющих микроорганизмов, которые можно будет использовать для производства биопрепаратов для очистки почв и воды от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Известно, что наиболее активными биодеструкторами углеводородов нефти являются представители актинобактерий. Однако, на сегодняшний день, соответствующей информации по мицелиальным актинобактериям крайне мало. Целью работы было изучение актиномицетного комплекса сапропеля, используемого в биотехнологии повышения нефтеизвлечения пластов и определение способности мицелиальных актинобактерий к биодеградации углеводородов нефти. Образец озерного мелкодисперсного сапропеля, добытый в районе г. Набережные Челны, исследовали с применением микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов.

Установлено, что мицелиальные актинобактерии являются неотъемлемым компонентом микробного комплекса сапропеля и представлены родом *Streptomyces*. Их численность составляла $7.84\times10^7$ КОЕ/г сапропеля. В структуре актиномицетного комплекса сапропеля на уровне секций и серий доминировали представители секции *Imperfectus* (72%). Из образца сапропеля выделено в чистую культуру 20 штаммов стрептомицетов, 8 из которых идентифицированы до вида по результатам анализа последовательностей гена 16SрРНК. Для двух штаммов – *Streptomyces albogriseolus* (S1) и *Streptomyces chartreusis* (S24) были определены оптимальные эко-физиологические условия роста – интервалы температур, содержание хлорида натрия в среде и уровень аэрации. Выявлена способность мицелиальных бактерий к биопленочному росту. Полученные результаты подтверждают возможность активного роста стрептомицетов в микроаэрофильных условиях заводняемого нефтяного пласта, образуя биопленки в порах и нишах нефтевмещающей породы, что позволит им не вымываться с водонефтяным током. Также, образуемые актинобактериями мицелиальные разрастания, сами по себе могут служить матриксом для прикрепления других бактерий, таким образом, образуя поликомпонентную биоплёнку. В ходе эксперимента по росту исследованных штаммов стрептомицетов на сырой нефти было выявлено, что *Streptomyces albogriseolus* и *Streptomyces chartreusis* способны к биодеградации алифатической фракции углеводородов нефти, снижая при этом поверхностное и межфазное натяжение культуральной жидкости. Экзогенные метаболиты исследованных штаммов образовывали водно-нефтяную эмульсию. Наибольшая эмульгирующая активность стрептомицетов зафиксирована при росте на нефти с добавлением в среду крахмала, согласно биотехнологии закачки в пласт сапропеля. Таким образом, в ходе биотехнологических мероприятий попадая вместе с микробным сообществом сапропеля в заводняемый нефтяной пласт мицелиальные бактерии участвуют в микробиологической трансформация органического вещества нефти с образованием нефтевытесняющих соединений.

Вывод: стрептомицеты участвуют в микробиологической трансформация органического вещества нефти с образованием нефтевытесняющих соединений, что делает их перспективными агентами как для использования в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения пластов, так и при создании биопрепаратов по очистке почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами.

*Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А19-119010590007-3.*

# Термостабильность метанолдегидрогеназы, выделенной из *Methylobacterium Extorquens* PCM 160

*Баклагина С.П.*

Тульский государственный университет, г. Тула, sofiabaklagina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38006

С помощью метилотрофных бактерий *Methylobacterium extorquens* в настоящее время производят различные ценные химикаты, такие как, эктоин и полигидроксибутират, благодаря их способности использовать метанол в качестве единственного источника углерода и энергии (Chistoserdova L., 2003; Ю.А. Троценко, 2012). Клетки этих бактерий характеризуются высокой концентрацией периплазматических дегидрогеназ, основной из которых является метанолдегидрогеназа (МДГ) – фермент, катализирующий окисление метанола до формальдегида, а также способный окислять первичные спирты и некоторые альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов. Для полной характеристики фермента и его дальнейшего применения необходимо учитывать температурную стабильность. Поэтому целью данной работы является изучение температурной стабильности фермента МДГ, выделенного из рекомбинантных клеток *M. extorquens* pCM160.

В качестве материала использовали биомассу бактерий *M. extorquens* pCM160, выращенную на качалке (180 об/мин) при 29 ºС в колбах Эрленмейера с 200 мл среды Канеда, содержащей (г/л): $KH_2PO_4$-2, $(NH_4)_2SO_4$ – 2, NaCl – 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,025, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,002, pH 7,2. Метанол и канамицин вносили в стерильные среды до концентрации 0,5% (по объему) и 50 мкг/мл соответственно. Клетки микроорганизмов отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут и промывали 50 мМ калий фосфатным буфером, pH 7,2. Для получения бесклеточного экстракта клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE150 (Англия) при охлаждении льдом: 15 циклов по 10 секунд с интервалом 60 секунд. Для выделения и очистки МДГ использовали металл-хелатную аффинную хроматографию. Никель-нитрилотриксусная (Ni-NTA) хроматография основана на образовании прочной связи белка с полигистидиновой меткой с комплексом никеля. После закрепления фермента на колонке проводится промывка буферами, содержащими разные концентрации имидазола (по возрастанию – 5 мМ, 60 мМ, 200 мМ), вследствие чего происходит элюция белка, а имидазол закрепляется на колонке. Для определения активности фермента МДГ использовали спектрофотометрический метод анализа по известной методике (Day, 1990). Определение концентрации белка проводили по методу Лоури.

Для проверки термостабильности фермента, МДГ инкубировали при различных температурах в диапазоне от 20 до 80 ºС в течение 20 мин и определяли активность МДГ в стандартной инкубационной смеси при 30 ºС (рис.).

Установлено, что фермент практически не изменял активность при инкубировании в температурном интервале от 20 до 30 °С. От 40 до 50 °С происходит незначительное снижение активности. При 70 °С наблюдали частичную денатурацию белка в кювете, а при увеличении температуры на 10 °С полную денатурацию – активность исчезала.

Полученные данные сравнили с литературными данными, где также изучалась термостабильность МДГ. Таким образом, установлено, что фермент, выделенный из клеток *Cupriavidus necator* N-1 и *Bacillus methanolicus* при инкубировании в температурном интервале от 25° до 45°, имеет достаточно высокую активность, а при 50° до 60° происходит резкое уменьшение активности фер-

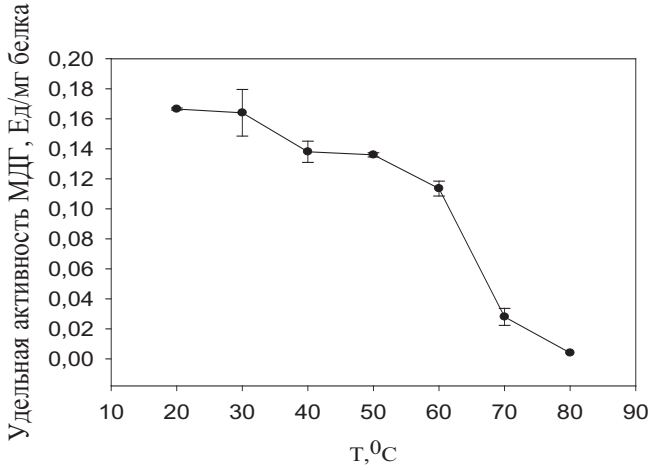



**Рис.** Температурная стабильность фермента МДГ M. extorquens pCM160

мента, вследствие его денатурации (Tung-Yun Wu, 2016; Anne Krog, 2013). Данные из других литературных источников сопоставимы с полученными нами результатами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Соглашение от «29» сентября 2021 г. № 075-03-2021-170/5 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).*

## Литература

1. *Chistoserdova L., Chen S.W., Lapidus A., Lidstrom M.E.* Methylotrophy in Methylobacterium extorquens AM1 from a genomic point of view // J Bacteriol. 2003. V. 185. P. 2980–2987.
2. *Троценко Ю.А. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии //* Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2012. Т. 5. № 3. С. 243-279.
3. *Day D.J.* Methanol dehydrogenase from Methylobacterium extorquens AM1 / D.J. Day and C. Anthony // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 210–216.
4. *Wu T.Y., Chen, C.T., Liu, J.T., Bogorad, I.W., Damoiseaux, R., and Liao, J.C.* Characterization and evolution of an activator-independent methanol dehydrogenase from *Cupriavidus necator* N-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100 *P.* 4969–4983.
5. *Anne Krog, Tonje M.B. Heggeset, Jonas E.N. Müller, Christiane E. Kupper, Olha Schneider, Julia A. Vorholt, Trond E. Ellingsen, Trygve Brautaset.* Methylotrophic *Bacillus methanolicus* Encodes Two Chromosomal and One Plasmid Born $NAD^+$ Dependent Methanol Dehydrogenase Paralogs with Different Catalytic and Biochemical Properties // PLoS One.2013.

# Микробные сообщества активных илов сооружений по очистке сточных вод города Москвы

*Бегматов Ш.А., Дорофеев А.Г., Кадников В.В., Белецкий А.В., Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В.*

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва, habegmatov@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38007

Микробные сообщества установок по очистке коммунальных сточных вод играют ключевую роль в удалении загрязняющих веществ, тем самым минимизируя вредное воздействие на окружающую среду. Состав микробных сообществ активного ила очистных сооружений сильно различаются в зависимости от используемой технологии, характеристик поступающих сточных вод и мощности очистных сооружений. Цель работы – характеристика состава микробных сообществ активного ила биореакторов девяти крупных очистных сооружений АО «Мосводоканал» города Москвы, работающих по разным технологиям. Два биореактора (№ 1 и № 7) представляют собой непрерывно аэрируемые аэротенки, в которых органическое вещество окисляется гетеротрофными микроорганизмами, а нитрификаторы окисляют аммоний с образованием нитрата. Технология последовательной нитрификации и денитрификации, в ходе которой в аэробных условиях происходит окисление органики и аммония, а в аноксидной – восстановление нитрата до газообразного азота, используется в биореакторе № 2. Остальные 6 установок используют трех-стадийный анаэробный/ аноксидный/ аэробный процесс, также известный как технология Кейптаунского университета (UCT). Эта технология позволяет эффективно очищать сточные воды от органических веществ (>98%), аммония (>99%) и фосфора (>90%), который накапливается в биомассе фосфат-аккумулирующих микроорганизмов (ФАО).

Анализ состава микробных сообществ активных илов с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК выявил в биореакторах от 3860 до 4868 оперативных таксоно-

мических единиц (OTE) на уровне 97% идентичности последовательностей. Анализ сообществ методом UniFrac, показал, что микробные сообщества кластеризуются в соответствии с типом использованной технологии. В сообществах обнаружены представители 53 филумов бактерий и архей, наиболее многочисленными из которых были *Proteobacteria, Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Chloroflexi*. Среди аммоний-окисляющих микроорганизмов обнаружены только бактерии семейства *Nitrosomonadaceae* (в основном род *Nitrosomonas*), доля которых коррелировала с эффективностью удаления аммония и составляла от 0.8% до 2.9% во всех биореакторах, обеспечивающих хорошую очистку от аммония (>99%), и была менее 0,4% в биореакторах № 1 и № 7, где эффективность его удаления была ниже.

ФАО *Ca*. Accumulibacter phosphatis обнаружены во всех образцах, причем их доля была наиболее низкой (0.1%) в биореакторе № 2, использующем технологию нитрификации/денитрификации. В других биореакторах доля *Ca*. Accumulibacter phosphatis составляла от 0.4 до 1% сообществ, и не коррелировала с эффективностью удаления фосфора или типом технологии очистки. Из потенциальных ФАО были обнаружены *Ca.* Microthrix, *Dechloromonas*, *Ca.* Obscuribacter, *Tetrasphaera* и *Thauera, Zoogloea* и *Thiothrix*. Гликоген-аккумулирующие бактерии *Ca*. Competibacter, обычно являющиеся «конкурентами» ФАО, составляли до 8,5% в биореакторах, использующих технологию UCT, но были малочисленными (<1%) в биореакторах №2 и №7.

Результаты сетевого анализа микробных сообществ выявили положительную корреляцию между денитрификаторами (*Thauera* и *Haliangium*) и бактериями, участвующими в окислении аммония до нитрата (*Nitrosomonas* и *Nitrospira*). Это согласуется с тем, что основным источником нитрата является микробное окисление аммония, а не поступающие сточные воды. Взаимного исключения *Ca*. Accumulibacter и *Ca*. Competibacter обнаружено не было.

Кластерный анализ составов микробных сообществ активных илов московских очистных сооружений и 269 установок по очистке сточных вод в 23 странах на 6 континентах, описанных Global Water Microbiome Consortium, показал, что все московские образцы образуют отдельную ветвь, не входящую в группы образцов из Западной Европы или иной крупный «географический» кластер. Эти данные свидетельствуют о том, что характеристики сточных вод, связанные с культурными, социальными и экологическими особенностями каждого региона, более важны для формирования микробных сообществ активных илов, чем используемые технологии очистки.

Полученные данные о составе микробных сообществ являются одной из основ совершенствования технологий очистки сточных вод, основанных на управлении микробными консорциумами активных илов.

*Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 21-64-00019*

## Изучение основных характеристик штамма микроорганизма выделенного с листьев ячменя

*Гасиева З.А.[1,2], Кудрявцев Д.В.[2], Галушко А.С.[2], Иванченко О.Б.[1], Панова Г.Г.[2]*

[1] ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург
[2] ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт», г. Санкт-Петербург, melkii844@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38008

Основным из перспективных исследований в области агробиотехнологии является обнаружение и выделение штаммов микроорганизмов, оказывающих стимулирующее влияние на рост растения. Основная необходимость в подобных организмах вытекает из токсичности и неэффективности применяемых химических удобрений [1, 2]. Бактерии, стимулирующие рост растений или PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), находят широкое применение во всех областях растениеводства, так как являются абсолютно безопасными как для растений, так и для окружающей среды. Среди PGPB выделяют эпифитные (обитающие на зеленой части растения) и ризосферные (симбионты корневой и прикорневой частей) микроорганизмы, среди которых встречаются бактерии, актиномицеты и грибки микоризы [3].

Целью исследования явилось изучение морфологических, культуральных свойств штамма, интенсивности роста, а также оценка потенциальной возможности использования его в качестве стимулятора роста растений.

## Материалы и методы

Предметом исследования явился штамм 6.3.2 (коллекция штаммов Агрофизического научно-исследовательского института), выделенный путём последовательного пересева ассоциации бактерий №6. Данная ассоциация была получена смывом с листьев ячменя, с последующим облучением ультрафиолетом.

Для описания морфологических и культуральных характеристик штамм бактерий выращивали на твёрдой питательной среде (ГРМ-агар). Микроскопирование культуры и окрашивание клеток по Граму проводили на третьи сутки культивирования.

Для изучения накопления культуры и динамики роста штамм пересевали с твёрдой среды в жидкую ГМФ и культивировали в течение трёх суток. Пробирку с выросшей культурой в последующем использовали в качестве посевного материала. Посев производили стерильно, внося 200 мкл в 5 мл жидкой среды ГМФ. Среда ГМФ была выбрана из-за того, что штамм не показывал роста на синтетических средах. Повторность опыта четырехкратная. Динамику роста культуры определяли по оптической плотности при длине волны 565 нм прибором «DEN-1B McFarland Densitometer BioSan» (Россия) со стандартами мутности для калибровки.

Кривую роста по данным оптической плотности строили в программе MS Exel.

Потенциальная возможность использования штамма в качестве стимулятора роста растений проверяли окрашиванием культуральной жидкости реактивом Сальковского [4]. Согласно методике, данный реактив окрашивает индольные соединения, в том числе ауксин – один наиболее известных растительных гормонов.

## Результаты и обсуждение

В ходе морфологического анализа стало известно, что штамм 6.3.2 на твёрдой питательной среде образует белые плотные колонии с волнистым краем и тусклым блеском. Поверхность колоний складчатая. Результаты микроскопирования показали, что по морфологии клетки имеют форму кокков. Окраска по Граму свидетельствует, что это Грамотрицательные клетки.

Динамика роста бактерий в простой периодической культуре представлена на рис. 1. Согласно графику, можно сделать заключить, что культура длительное время (в течение 4-х суток) адаптируется к среде, затем очень резко выходит в лаг-фазу, после которой можно наблюдать пик (6-е сутки). После этого культура длительное время находится в стационарной фазе, и, как можно видеть, за 30 суток культивирования так и не вышла в стадию отмирания.

Наиболее известным и распространенным фитогормоном, синтезируемым PGPB, является ауксин. Ауксин является сигнальным гормоном, помогающим растению адаптироваться к стрессу. Кроме того,

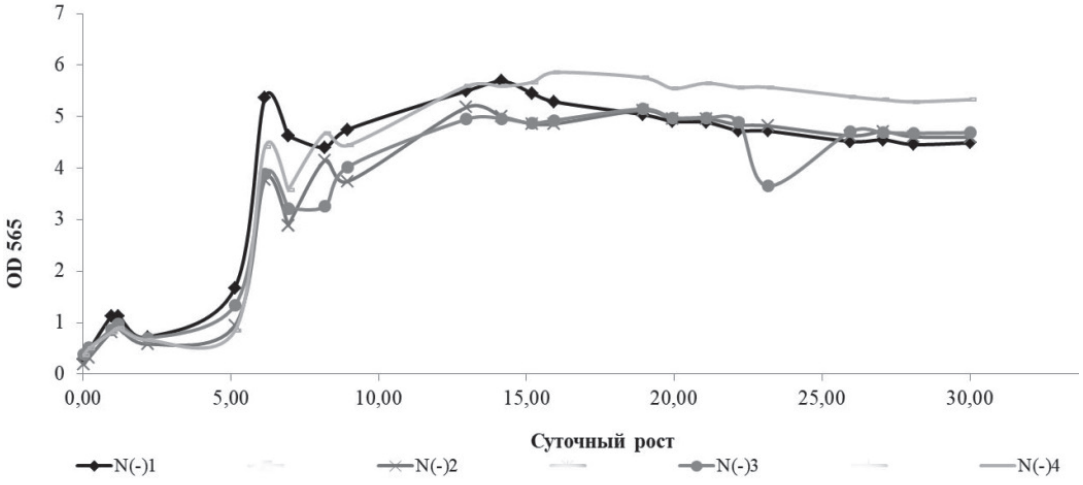



**Рис. 1.** Кривая роста штамма 6.3.2 на среде ГМФ, где N-повторности

он стимулирует рост корней растений. Нам представлялось интересным оценить интенсивность синтеза ауксина данным микроорганизмом. Предварительные эксперименты показали, что реакции с реактивом Сальковского дает бледное розовое окрашивание, что свидетельствует о выделении бактериями растительного гормона. Однако результаты перспектив использования штамма в качестве стимулятора роста оказались недостаточно достоверны. Дело в том, что используемая для культивирования среда ГМФ имеет желтый цвет, что затрудняет окрашивание потенциально содержащихся в ней ауксинов. Вместе с тем, можно сделать вывод, что культура является потенциально интересной для изучения перспектив её использования в сельском хозяйстве и необходимо её дальнейшее изучение.

## Литература


1. *Bernard R.* Glick Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, Scientifica, Volume 10, 2012, 1–15 p.
2. *Чеботарь В.К.* Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова, С.Н. Масленникова, А.Н. Заплаткин, Н.В. Мальфанова // Сельскохозяйственная биология, 2015, т. 50,5, с. 648–654.
3. *Гасиева З.А., Кудрявцев Д.В., Галушко А.С., Иванченко О.Б., Панова Г.Г.* Исследование особенностей образования индол-3-уксусной кислоты эпифитными бактериями, выделенных с листьев ярового ячменя / В сборнике: Пищевые технологии и биотехнологии. Материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная Году науки и технологий в Российской Федерации. Под редакцией А.С. Сироткина. Казань, 2021. С. 288–294.
4. *Glickmann E., Dessau Y.* A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria, Applied and environmental microbiology, Feb. 1995, p. 793–796.


# Влияние некоторых ионов тяжелых металлов на биоэлектрогенез микробных топливных элементов


*Гасюк О.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Самков А.А., Худокормов А.А.*

Кубанский государственный университет, Краснодар, lelya.gasyuk@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38009


Одними из важных задач общества 21 века является поиск альтернативных источников энергии и улучшение качества окружающей среды. Одними из перспективных систем для решения данных задач считаются микробные топливные элементы (МТЭ). Данные биотехнологические устройства позволяют получать электроэнергию в результате биоэлектрохимической активности анодофильных микроорганизмов. В результате происходит преобразование энергии химических связей органических веществ в электроэнергию при помощи микроорганизмов.

Использование микробных топливных элементов в процессе ремедиации может стать один из перспективных методов очистки окружающей среды от различных поллютантов (фосфаты, УВ, СПАВ, тяжёлые металлы, пестициды и др.). Биоэлектрохимические системы потенциально могут длительное время работать в полевых условиях без внешнего воздействия, при этом генерируя возобновляемую электроэнергию, которая может быть использована для других устройств (приборы освещения, датчики контроля среды и др.). В качестве анодофильной культуры в МТЭ может использоваться как местная микробиота, так и в дополнение к ней интродуцироваться лабораторные штаммы-деструкторы, способные к очистке среды от целевых поллютантов. Таким образом, мы можем повысить эффективность удаления того или иного загрязнителя.

Целью данного исследования было выяснить влияние тяжёлых металлов (ТМ) на биоэлектрогенез МТЭ, для последующего использования данных устройств в ремедиации среды загрязнённой ТМ.

В исследовании использовались микробные топливные элементы бентосного типа, с горизонтальными электродами. В качестве твёрдой фазы использовался песок из высохших участков речного дна.

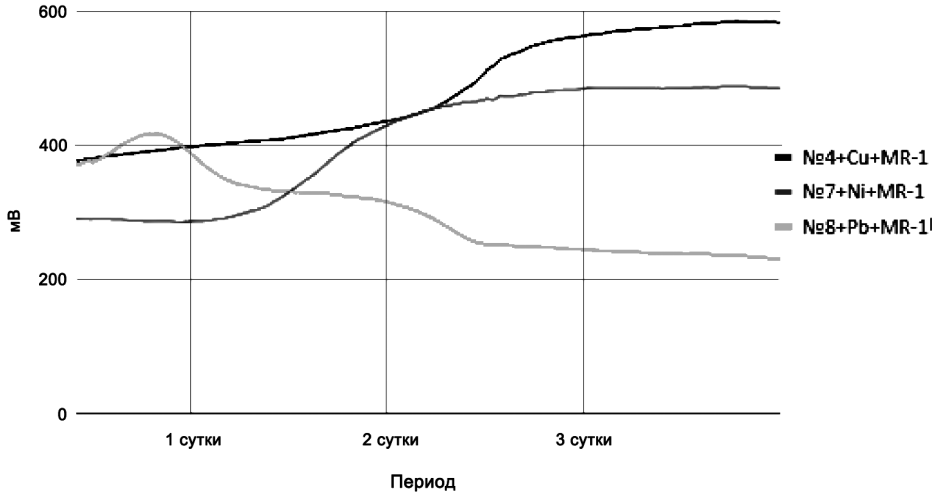



**Рис. 1.** Биоэлектрогенез в МТЭ инокулированных S. oneidensis MR-1 в присутствии ТМ

Электроды были изготовлены из углеродного войлока «Карбопон» и графитовых стрежней. Электрогенез фиксировался при помощи автоматического вольтметра авторской конструкции. В качестве поллютантов использовались соли $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Для повышения биоэлектрогенеза МТЭ использовался лабораторный штамм *Shewanella oneidensis* MR-1, полученный из ВКПМ (№ B-9861), данная культура так же известна тем, что способна восстанавливать катионы тяжёлых металлов.

Эксперимент представлял собой шесть устройств микробных топливных элементов, в три из них вносился штамм *S. oneidensis* MR-1. Тяжёлые металлы вносились в систему в концентрации 7 ПДК, что соответствует описанным в литературе данным загрязнения ТМ донных отложений Чёрного и Японского морей. В первые трое суток эксперимента среднее значение напряжения в МТЭ без штамма *S. oneidensis* MR-1 составило: с $Cu^{2+}$ – 74,9 мВ, с $Ni^{2+}$ – 376,1 мВ, с $Pb^{2+}$ – 421,7 мВ. Среднее напряжение в МТЭ, инокулированных шеванеллой: с $Cu^{2+}$ – 481,2 мВ, с $Ni^{2+}$ – 408,8 мВ, с $Pb^{2+}$ – 299,5 мВ (рис. 1). По этим данным видно, что электрогенез МТЭ в присутствии *S. oneidensis* MR-1 выше по сравнению с МТЭ, где отсутствует лабораторный штамм, что может свидетельствовать о большей устойчивости шеванеллы к ТМ, чем местной микробиоты.

Таким образом, присутствии катионов ТМ в микробных топливных элементах не оказывает сильного негативного воздействие на биоэлектрогенез. Данного напряжения теоретически будет достаточно для процессов ремедиации среды, загрязнённой металлами, так для смещения катионов в сторону анода согласно расчётным данным необходимы величины потенциалов: $Pb^{2+}$ – 49 мВ, $Cu^{2+}$ – 150 мВ, $Ni^{2+}$ – 179 мВ. Поэтому данные устройства могут быть потенциально использованы для очистки вод и донных отложений от тяжёлых металлов с получением возобновляемой энергии.

## Эффективность использования криопротектора на основе смектита для пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

*Дбар С.Д., Сорокина Е.В., Стоянова Л.Г.*

Кафедра микробиологии биологического ф-та МГУ им. М.В.Ломоносова, stoyanovamsu@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38010

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на безопасные препараты, полезные для здоровья. Пробиотические препараты на основе молочнокислых бактерий (МКБ) благотворно влияют на функционирование органов всего организма человека, его микробиом, а также иммунную и эндокринную систему, поскольку являются частью микробиоты пищеварительного трак-

та и заквасочной культурой при производстве широко используемых молочнокислых продуктов [1, 2]. Основным требованием к пробиотикам является стабильность их полезных свойств при производстве и длительном хранении. Известны разные способы хранения культур: в обрате с периодическими пересевами, высушиванием с использованием криопротекторов [3, 4]. При хранении в виде молочного сгустка лактококки требуют пересева по крайней мере 1 раз в месяц, но при частых пассажах снижается их молокосвертывающая активность (С-активность), в популяции накапливаются диссоцианты с низкой активностью [5]. Перспективным методом хранения микроорганизмов является лиофилизация. Но в процессе лиофилизации бактериальная мембрана и клеточная стенка могут быть повреждены из-за низких температур предварительного замораживания, мембранных фазовых переходов, кристаллизации воды, осмотического стресса [3, 4]. Криопротекторы защищают клетки, увеличивая концентрацию растворенных веществ в клетках. Однако для того, чтобы быть биологически совместимыми, криопротекторы должны легко проникать в клетки и не быть токсичными для самих клеток. Известно взаимодействие бактериальных клеток с частицами глинистых минералов, которые меньше самих бактериальных клеток. Эти частицы и бактериальные клетки часто образуют прочные агрегаты. Особенно прочные агрегаты образуются частицами смектитовой (монтоморилонитовой) глины, которая влияет на дыхательную активность микробов. По мере увеличения концентрации минералов дыхательная активность бактериальных клеток увеличивается [6]. Фирма Bento Health Ltd. (София, Болгария) разработала новый инновационный, натуральный продукт, представляющий смесь природных неметаллических минералов на основе смектита PROBENT, который улучшает эффективность пробиотиков за счет увеличения выживаемости бактерий в стрессовых условиях желудочно-кишечного тракта (полезная модель, регистрационный номер 3410 U1 от 10.022020, Болгария, www.bento-health.com).

**Цель работы** – показать эффективность использования криопротектора PROBENT на стадии лиофилизации для пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

**Объектами исследования** служили штаммы мезофильных *L. lactis* ssp. *lactis*, выделенные из микробиоты молочных продуктов, имеющих высокий пробиотический потенциал [2, 5]. Перед лиофилизацией лактококки центрифугировали при 1430 об/мин, клетки отмывали от среды. Сравнивали влияние 4-х защитных сред, добавляемых перед замораживанием: физраствор, обезжиренное молоко, 10% сахарозы +5% желатин и криопротектор ProBent. в концентрациях от 0 до 10%. Токсичность криопротектора ProBent проводили с использованием генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1, тест-система «Эколюм-08» [8]. Для лиофилизации использовалась вакуумная установка LABCONCO FreeZone1 (США) с глубиной вакуума 4,3 Па, температурой конденсора -52 °С.

**Результаты** показали, что индекс токсичности при взаимодействии биосенсора *Escherichia coli* K12 TG1 с криопротектором ProBent был отрицательным. Оптимальные нетоксичные концентрации криопротектора составили 5% и 10%, которые в дальнейшем были использованы при добавлении к суспензии лактококков для лиофилизации. Сохранение жизнеспособности клеток в процессе лиофилизации обусловлено как начальной высокой ($1\times10^9$ КОЕ/г) концентрацией клеток, так и присутствием в среде криопротектора ProBent. При посеве лиофильно высушенной культуры с ProBent (5–10%) после ресуспендирования в стерильной воде в жидкую биосинтетическую среду через 10–12 ч наблюдался активный рост, подтверждаемый интенсивным помутнением среды и активным кислотообразованием (pH снизился до 4.2, что характерно для гомоферментативных лактококков). При рассеве восстановленных культур, высушенных с ProBent, через 6 и 10 месяцев хранения установлена высокая жизнеспособность (90–95%), а при использовании обезжиренного молока, сахарозы с желатиной и физраствора выживаемость снизилась до 50, 70–80%, соответственно. В той же последовательности снизилась и С-активность лактококков: время образования сгустка увеличилось от 8 ч при использовании 10% ProBent, до 18ч при высушивании в сахарозе с желатиной и до 48 ч при хранении в обрате. Хранение лактококков, высушенных без криопротекторов, в течение 10 месяцев снизило кислотообразующую активностьи на 60%, а с ProBent кислотообразование снизилось не более чем на 3–10%. При периодических пассажах количество жизнеспособных клеток, храненных в виде молочного сгустка, на 3 порядка ниже, чем при хранении этих культур в лиофильном состоянии.

**Заключение.** Польза пробиотиков для здоровья, как правило, может быть достигнута при попадании в организм не менее $10^6$–$10^7$ КОЕ жизнеспособных клеток на грамм продукта-носителя. Внесение криопротектора ProBent на стадии лиофилизации *L. lactis* ssp. *lactis* сохраняет высокий уровень жизнеспособности пробиотика и усиливает их пробиотический эффект. ProBent не просто экологичный, но

и очень полезный материал с высокой сорбционной активностью, который используют как БАД или пребиотик [7]. Поэтому отмывание пробиотической композиции от этого компонента при пероральном употреблении не требуется. Новые области применения пробиотиков такие как терапия, разработка пероральных вакцин, а также в качестве поставщиков биопротекторных агентов, имеют важное значение для профилактики инфекций и улучшения здоровья.

## Литература


1. *Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. V. 11. P. 506–514.
2. *Стоянова Л.Г., Габриэлян Н.И.* Перспективность использования пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* при лечении госпитальных инфекций // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9. № 4. С. 110.
3. *Nuryshev M.Z., Stoyanova L.G., Netrusov A.I.* New Probiotic Culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: Effective opportunities and prospects // J Microb Biochem Technol. 2016. V. 8. N. 4. P. 290–295.
4. *Kurtmann L., Carlsen C.U., Risbo J., Skibsted L.H.* Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate // Cryobiology. 2009. V. 58. N. 2. P. 175–180.
5. *Iaconelli C., Lemetais G., Kechaou N., Chain F., Bermúdez-Humarán L.G., Langella P., Gervais P., Beney L.* Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities // J Biotechnol. 2015. V. 214. P. 17–26.
6. *Устюгова Е.А., Федорова Г.Б., Катруха Г.С., Стоянова Л.Г.* Изучение антибиотического комплекса, образуемого *Latococcus lactis* subsp. *Lactis* 194, вариант-К // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 644–650.
7. *Buccigrossi, V., Russo, C., Guarino, A., de Freitas M.B., Guarino G.* Mechanisms of antidiarrhoeal effects by diosmectite in human intestinal cells // Gut Pathog. 2017. V. 9. P. 23.
8. *Sorokina E.V., Vodolazov I.R., Oleskin A.V.* Stimulatory and Toxic Effects of Neurotransmitters on the lux Operon-Dependent Bioluminescence of *Escherichia coli* K12 TGI // J Pharm. Nutrit. Sci. 2019. V. 9, N. 3. P. 136–143.


# Трансформация холевой кислоты психрофильными бактериями родов *Psychrobacter* и *Arthrobacter*


*Дещеревская Н.О.[1], Казанцев А.В.[2], Донова М.В.[1]*

[1] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, Россия

[2] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38011


Стероидные соединения (стерины, стероидные гормоны, желчные кислоты и др.) повсеместно распространены в природе, и их биодеградация играет важную роль в глобальном цикле углерода. Стероиды синтезируются эукариотическими организмами, но их деградацию осуществляют почти исключительно бактерии. Наличие путей деградации стероидов установлено для бактерий различных классов, выделенных из разнообразных мест обитания (почва, вода, морские губки, эукариотические организмы-хозяева, и др.) [1], однако, способность психрофильных бактерий к окислению стероидов, и в частности, желчных кислот, остается практически не изученной.

Ранее из 60 штаммов, выделенных из образцов мерзлых отложений в районе п. Баренцбург архипелага Шпицберген с глубин от 0,5 до 3,7 м, отобраны по крайней мере 10 штаммов, способных к биоконверсии или биодеградации стероидов [2]. В настоящей работе оценена способность ряда штаммов психрофильных аэробных бактерий из ВКМ ИБФМ РАН: *P. immobilis* ВКМ В-2835, *P.maritims* ВКМ В-2838, *P. arcticus* ВКМ В-2377, *P. aquamaris* ВКМ В-2839 и штамма *Arthrobacter* sp. EMg2 из образцов мерзлых отложений к трансформации холевой кислоты (ХК).

Штаммы культивировали в аэробных условиях (220 об/мин) на среде 5/5 (МПБ). Все эксперименты проводились при температуре 20 °С. Трансформацию ХК (1 г/л) проводили в течение не менее 120 часов, на среде, содержащей (г/л): глицерин – 5; $KH_2PO_4$ – 1, $K_2HPO_4$ – 4, $(NH_4)_2SO_4$ – 3, мочевина – 0.25, $MgSO_4$ – 0.2, $FeSO_4$ – 0.01, $ZnSO_4$ – 0.002; pH 7.0. Стероиды экстрагировали этилацетатом (1:1 по объему) и разделяли препаративной хроматографией в системе хлороформ/ацетон/уксусная кислота (1:1:0,01, объемн.). Очистку стероидов проводили с применением хроматографических пластин DC-Fertiplatten SIL G-200 UV254 (Macherey-Nagel, Germany). Спектры ESI-MS регистрировали на масс-спектрометре FT-ICR APEX II и программном обеспечении Xmass (Bruker Daltonics, США). Спектры 13С-ЯМР записаны на спектрометре Bruker AC500 (500 МГц) (США).

Штаммы рода *Psychrobacter* проявляли преимущественно дегидрогеназную активность в отношении гидроксильных групп в кольце А, а штамм *Arthrobacter* sp. EMg2 окислял гидроксильные группы в положениях 3α и 12α (табл. 1, рис. 1). Согласно имеющимся представлениям о механизмах бактериальной деградации желчных кислот, данные реакции могут быть рассмотрены как начальные этапы окислительной деградации стероидного ядра [3]. Однако, как показали наши предварительные эксперименты, исследованные штаммы не способны к росту на стероидных субстратах в качестве единственных источников углерода и энергии, что указывает на возможность осуществления реакций неспецифическими дегидрогеназами, способными окислять гидроксигруппы ксенобиотиков.

*Таблица 1*

**Основные продукты трансформации холевой кислоты психрофильными бактериями**

| Штамм | Основной метаболит | Мол. масса. | Другие метаболиты* | Остаточный субстрат (ХК)** |
|---|---|---|---|---|
| *P. immobilis* ВКМ В-2835 | 7-кето-ХК | 406.56 | 12-кето-ДХК, ХДХК | Менее 5 % |
| *P. maritimus* ВКМ В-2838 | 3-кето-ХК | 406.56 | ХДХК | 15–20% |
| *P. aquamaris* ВКМ В-2839 | 7-кето-ХК | 406.56 | | 15–20% |
| *P. arcticus* ВКМ В-2377 | Смесь метаболитов | – | Смесь метаболитов, включая 7-кето-ХК | 15–20% |
| *Arthrobacter* sp. EMg2 | 3,12-дикето ХК | 404.55 | | 20–25% |

* Предположительная структура дана на основании результатов ТСХ (сравнение с аутентичными стандартами); ** через 120 часов трансформации.

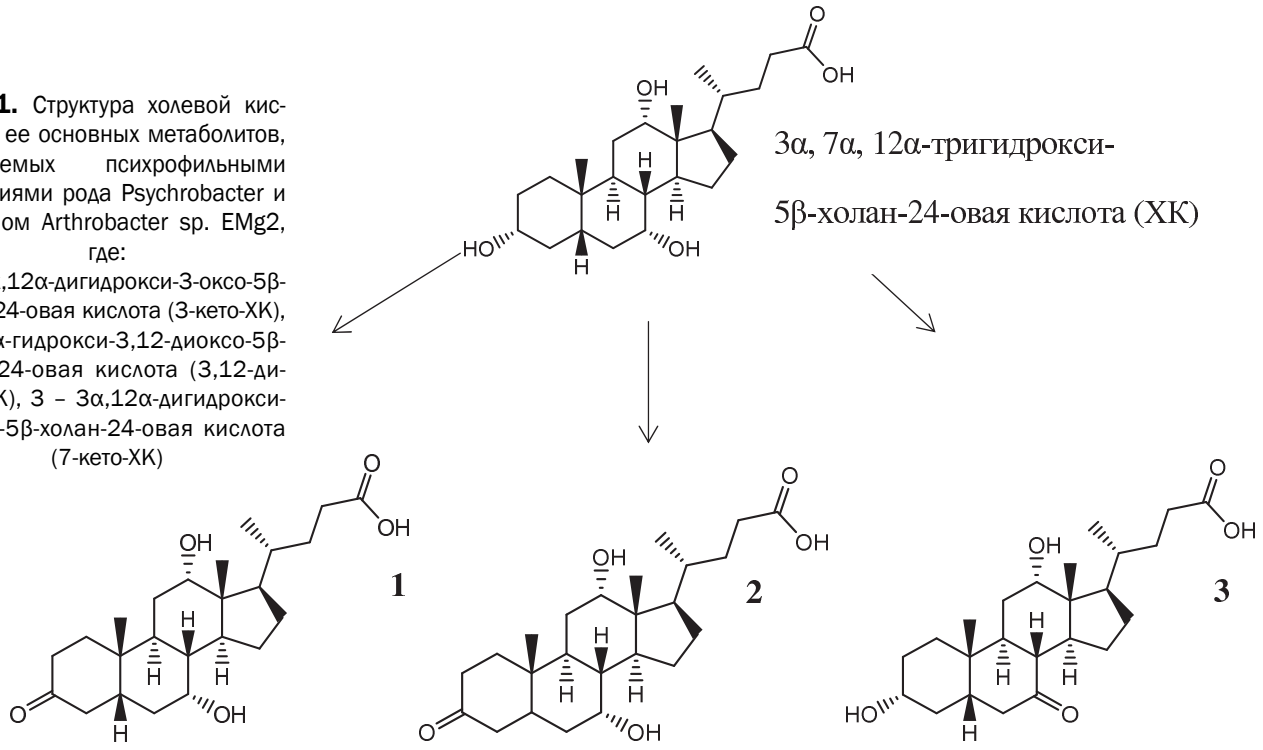



**Рис. 1.** Структура холевой кислоты и ее основных метаболитов, образуемых психрофильными бактериями рода Psychrobacter и штаммом Arthrobacter sp. EMg2, где:
1 – 7α,12α-дигидрокси-3-оксо-5β-холан-24-овая кислота (3-кето-ХК), 2 – 7α-гидрокси-3,12-диоксо-5β-холан-24-овая кислота (3,12-дикето-ХК), 3 – 3α,12α-дигидрокси-7-оксо-5β-холан-24-овая кислота (7-кето-ХК)

Возможность трансформировать ХК в 7-оксо- и 12-оксо-производные была ранее упомянута только для отдельных представителей мезофильных протеобактерий и актинобактерий [3, 4]. Данные о трансформации ХК в 3, 7 и 12-кетопроизводные психрофильными бактериями получены впервые.

Представленные результаты расширяют представления о глобальном распространении и разнообразии стероидтрансформирующих бактерий.

*Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-00024).*

## Литература

1. *Bergstrand L., Cardenas E., Holert J., Hamme J., Mohn W.* Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis. MBio, 2016, 7, 2. e00166-16.
2. *Замалутдинова С.В., Трубицын В.Э., Дещеревская Н.О., Донова М.В., Щербакова В.А.* Новые психрофильные бактерии и определение их способности к трансформации стеринов и холевых кислот. V Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» 2018. С. 93.
3. *Feller F.M., Holert J., Yücel O., B. Philipp.* Degradation of bile acids by soil and water bacteria. Microorganisms, 2021, 9, 1759 – 68.
4. *Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Kollerov V.V., Kazantsev A.V., Donova M.V.* Search and discovery of actinobacteria capable of transforming deoxycholic and cholic acids. J Mol Catalysis B: Enzymatic. 2016, 133, 157-165. DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.12.010

# Биодеструкторы афлатоксина B1 и ингибиторы его биосинтеза у токсигенных аспергиллов – возможное решение проблем загрязнения сельскохозяйственной продукции

*Джавахия В.Г.*

Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Большие Вязёмы, Московская область,
dzhavakhiya@yahoo.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38012

Загрязнение сельскохозяйственных культур и пищевых продуктов грибами рода Aspergillus является экономически значимой проблемой для южных районов РФ. По мере потепления климата это становится актуальным и для средней полосы страны. В докладе будут представлены сведения о роли токсигенных грибов в снижении продуктивности растений, описано вредное воздействие микозов на человека и животных и приведены результаты исследований распространенности афлатоксигенных грибов в России. Описаны биологические и небиологические методы снижения загрязненности сельскохозяйственных продуктов афлатоксинами и их продуцентами [1], включая разработки ВНИИ фитопатологии (ВНИИФ) РАН.

Известно, что среди 180 видов рода *Aspergillu*s четыре – *A. fumigatus, A. terreus, A. niger* и *A. flavus* – представляют опасность для человека. Продуцируемые ими афлатоксины обнаруживаются в пшенице, кукурузе, ячмене, рисе, сое, некоторых овощах, а также в различных орехах и бобах. Токсины обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными и иммунодепрессивными свойствами, а также гепатотропной активностью.

Способность продуцировать афлатоксины не является необходимым свойством для развития грибов-продуцентов. Имеется ряд предположений относительно функций афлатоксинов. Они могли бы выполнять роль химических сигналов при взаимодействии с другими микроорганизмами в природе, или защищать гриб-продуцент от конкурирующих микроорганизмов. Имеется также предположение, что афлатоксины могут синтезироваться в ответ на окислительный стресс, перехватывая избыток активных форм кислорода, токсичных для гриба-продуцента. По-видимому, афлатоксины не влияют на процесс заражения грибом растений, поскольку они не обладают фитотоксичностью.

Применяемые в настоящее время средства защиты сельскохозяйственных культур от токсигенных грибов (агротехнические, химические и биологические) недостаточно эффективны для кардинального решения проблемы.

Методы декотаминации подразделяются на механические, физические, химические и биологические. Механические методы основаны на очистке орехов или зерна от скорлупы или шелухи, а также отделения контаминированной части продукции от чистой. Общими недостатками таких методов является высокая трудозатратность. Физические методы подразделяются на термические (обжарка, автоклавирование, микроволновая обработка, экструзия и т.п.) и нетермические (обработка ультрафиолетом, гамма-лучами, светоимпульсами и низкотемпературной плазмой). Химическая детоксикация подразумевает трансформацию микотоксинов в менее токсичные и мутагенные соединения. Трансформирующими агентами могут выступать различные органические кислоты, щелочи, окислители (например, озон, перекись водорода, электролизованная вода), восстановители и хлоросодержащие агенты. Эффективность таких методов детоксикации может варьировать, достигая 90–100. Эти обработки, однако, часто приводят к ухудшению качества продукции и к дополнительным затратам на очистку продукта от непрореагировавших остатков и отрицательному отношению потребителей.

Наиболее экологичным методом детоксикации считается использование микроорганизмов-деструкторов микотоксинов. Воздействие таких деструкторов приводит к трансформации микотоксинов в нетоксичные, или менее токсичные, по сравнению с исходным токсином, соединения. Потенциальными биодеструкторами могут служить как живые микроорганизмы (бактерии или грибы), так и их ферменты. Биодеградация микотоксинов, по сравнению с физическими и химическими методами деконтаминации, имеет ряд преимуществ: она специфична и достаточно быстро происходит в условиях, которые приемлемы для обработки сельскохозяйственного сырья и продуктов. Недостатками метода может быть возможное ухудшение качества продуктов из-за синтеза биодеструктором нежелательных метаболитов, а также зависимость эффективности биодеградации от условий окружающей среды.

Возможности биологических методов снижения загрязнения сельскохозяйственных продуктов микотоксинами и их продуцентами изучаются во ВНИИФ. Одним из основных направлений является разработка методов биодеградации афлатоксинов с помощью микробных ферментов, специфически разрушающих эти токсины. С этой целью исследователи применяют подход, суть которого состоит в поиске потенциальных биодеструкторов в природных консорциумах микромицетов, в которых присутствуют токсигенные изоляты *Aspergillus flavus*. В результате удалось из природных субстратов, содержащих токсигенный *A. flavus*, выделить сопутствующие ему изоляты грибов и изучена их способность к катаболизму афлатоксина B1 (АФВ1). Были выявлены активные штаммы-деструкторы афлатоксина, относящиеся к родам *Gliocladium, Phoma* и *Trichoderma*. Внеклеточные метаболиты штамма *P. glomerata* PG41 в течение 3 суток разлагали 78% АФВ1, добавленного в среду культивирования [2], а штамм *G. roseum* GRZ7 в течение 7 суток инкубации разлагал до 90% АФВ1, добавленного в среду культивирования. Был определен фермент, ответственный за токсиндеградирующую активность штамма GRZ7 (лактоназа), показана способность этого фермента разрушать и другой поликетидный микотоксин – зеараленон. Получена рекомбинантная лактоназа, которая способна в течение 3 часов полностью разрушать зеараленон, добавленный в среду инкубации [3]. Полученный фермент может оказаться перспективным средством для деконтаминации как минимум кормовой продукции.

Другим возможным подходом к снижению уровня накопления микотоксинов в процессе хранения сельскохозяйственной продукции является применение веществ, способных блокировать биосинтез микотоксинов. Поиск таких специфических ингибиторов биосинтеза АФВ1 осуществляется одной из исследовательской групп ВНИИФ. В результате проведенного скрининга различных природных соединений были выявлены вещества, эффективно блокирующие биосинтез поликетидов, к которым относятся некоторые микотоксины, в том числе и афлатоксины. Один из выявленных блокаторов (препарат ML-236B) в концентрации 25 мкг/мл и выше оказался способен не только к подавлению биосинтеза АФВ1 при культивировании гриба *A. flavus* на агаризованной среде, но также к депигментации мицелия и подавлению спорообразования. Это же вещество в концентрации 2,5 мкг/мл при росте гриба в жидкой питательной среде было способно снижать продукцию АФВ1 в 50 раз по сравнению с контролем. Обработка зерна кукурузы и пшеницы раствором ML-236B в концентрации 50 мкг/г зерна. перед искусственным заражением *A. flavus,* снижала уровень накопления АФВ1 в 15 и 14 раз, соответственно. Комбинирование такой обработки с последующей обработкой деструктором (ферментным препа-

ратом на основе активной фракции PG41) приводило к дальнейшему снижению содержания АФВ1 до следовых количеств. Продуцентом ML-236B является гриб *Penicillium citrinum*. Нами получен мутантный штамм-суперпродуцент этого ингибитора и разработан лабораторный регламент на его производство. В настоящее время начата разработка технологии применения ML-236B для сельскохозяйственного производства и хранения кормов.

## Литература


1. *Джавахия В.Г., Стацюк Н.В., Щербакова Л.А., Поплетаева С.Б.* Афлатоксины: ингибирование биосинтеза, профилактика загрязнения и деконтаминация агропродукции. Москва, 2017, 162 с.
2. *Shcherbakova L., N. Statsyuk, O. Mikityuk, T. Nazarova, V. Dzhavakhiya* Aflatoxin B1 degradation by metabolites of *Phoma glomerata* PG41 isolated from natural substrate colonized by aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. Jundishapur J. Microbiol., 2015; 8(1):e24324.
3. *Shcherbakova L., Rozhkova A., Osipov D., Zorov I., Mikityuk O., Statsyuk N., Sinitsyna O., Dzhavakhiya V., Sinitsyn A.* Effective zearalenone degradation in model solutions and infected wheat grain using a novel heterologous lactonohydrolase secreted by recombinant *Penicillium canescens*. Toxins. 2020. 8. 475. 1–15.


# Применение грибных оксидазных препаратов для биоремедиации почвенных и водных систем


*Егорова А.Д., Черных А.М., Ренфельд Ж.В., Коломыцева М.П.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
anneteshebanova@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38013


Промышленные красители и промежуточные продукты их разложения, попадая в водные экосистемы в следствие сброса недоочищенных сточных вод предприятий, могут адсорбироваться твердыми поверхностями, а также тканями и органами живых организмов, блокировать прохождение солнечных лучей, тем самым приводя к снижению фотосинтеза, уменьшению водного биоразнообразия и нарушению водных экосистем в целом. Использование вод из загрязненных ресурсов для сельскохозяйственного назначения в свою очередь приводит к накаплению токсичных соединений в сельскохозяйственных продуктах, которые поступают на стол человека и в корм животных, подвергая их токсичному, канцерогенному, тератогенному и мутагенному влиянию (Lellis et al., 2019; Elmoubarki et al., 2015, Wu et al., 2017).

Одним из наиболее перспективных промышленно ценных ферментов для биодеградации и детоксикации красителей в водной среде и почве может быть лакказа (КФ 1.10.3.2, *п*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, «голубая» оксидаза), уже зарекомендовавшая себя в ряде современных биотехнологий (Baldrian, 2006; Lellis et al., 2019). Препараты грибных оксидаз являются одним из наиболее распространенных инструментов в современной биотехнологии для деградации ксенобиотиков, трансформации продуктов разложения лигнина, отбеливания растительного волокна, получения биологически ценных соединений (биополимеров, антиоксидантов, противоопухолевых препаратов, антибиотиков и др.), обесцвечивания красителей в стоках текстильных, бумажных, пищевых, фармацевтических и рыбовладельческих предприятий (Margot et al., 2013; Zucca et al., 2015).

Благодаря высокой адаптации и толерантности к условиям окружающей среды аскомицеты и их оксидазные препараты наиболее привлекательны для технологий биоремедиации загрязненных стойкими промышленными красителями и другими токсичными веществами почв и водных ресурсов. Используемый в настоящей работе гриб *Thielavia ovispora* неприхотлив в культивированию, способен проявлять оксидазную активность на ранние сутки. Показано, что «голубые» оксидазы аскомицета *T. ovispora* способны активно обесцвечивать промышленные красители в отсутствие медиаторов. Подобраны оптималь-

ные условия продукции голубых оксидаз гриба при погруженном культивировании в бедной минеральной среде с добавлением в качестве натурального источника углерода и энергии размельченных семян гороха до получения максимальной лакказной активности в культуральной жидкости.

Протестированы различные оксидазные препараты гриба *Thielavia ovispora* (мицелий гриба, культуральная жидкость и очищенные ферментные препараты), показавшие высокую активность в почве и водной среде в отношении малахитового зелёного (одного из наиболее распространённых в мире красителей трифенилметанового ряда, активно производимого для нужд промышленности и медицины). Исследованные препараты были способны разложить до 65–100% 125 мг/л малахитового зеленого в течение 6–48 часов инкубирования в зависимости от используемого препарата, что соответствует мировым аналогам и в некоторых случаях превосходит их. Разработана схема очистки оксидаз, позволяющая выделить 3 гомогенных ферментных препарата с деколоризующей активностью. Показано, что доминирующая оксидаза способна активно деколоризовать без использования медиаторов широкий спектр других промышленных красителей, среди которых красители трифенилметанового ряда и азокрасители. Получена полная нуклеотидная последовательность гена лакказы гриба *T. ovispora* и проведен ее филогенетический анализ в сравнении с известными лакказными генами аско- и базидиомицетов.

*Работа поддержана Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект №15500ГУ/2020, в рамках программы "УМНИК-2019").*

## Литература

1. *Baldrian P.* Fungal laccases–occurrence and properties, FEMS Microbiol. Rev. 30 (2006) 215–242, https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
2. *Elmoubarki R., Mahjoubi F.Z., Tounsadi H., Moustadraf J., Abdennouri M., Zouhri A., El Albani A., Barka N.* Adsorption of textile dyes on raw and decanted Moroccan clays: kinetics, equilibrium and thermodynamics. Water Res. Ind., Vol. 9, (2015) P. 16–29. https://doi.org/10.1016/j.wri.2014.11.001.
3. *Lellis B., Fávaro-Polonio C.Z., Pamphile J.A., Polonio J.C.* Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. Biotechnol. Res. Innov., Vol. 3, (2019) P. 275-290. https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001.
4. *Margot J., Bennati-Granier C., Maillard J., Bl´anquez P., Barry D.A., Holliger C.* Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation, AMB Express 3 (2013) 63–77, https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-63.
5. *Wu L., Lin Z.Z., Zhong H.P., Chen X.M., Huang Z.Y.* Rapid determination of malachite green in water and fish using a fluorescent probe based on CdTe quantum dots coated with molecularly imprinted polymer. Sens. Act. B Chem., Vol. 239, (2017) P. 69-75. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.166.
6. *Zucca P., Cocco G., Sollai F., Sanjust E.* Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes, Biocatalysis 1 (2015) 82–108, https://doi.org/10.1515/boca-2015-0007.

# Исследование гидролазной активности бактерий в отношении промышленных полимерных материалов

*Егорова А.Д.[1], Серёгина К.К.[2], Черных А.М.[1], Ренфельд Ж.В.[1], Коломыцева М.П.[1]*

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
[2] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва,
anneteshebanova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38014

Накопление пластиковых отходов – это серьезная экологическая и социальная проблема. Тем не менее, пластик в современной жизни встречаются практически повсюду. Он нужен нам для решения таких вопросов, как обеспечение продовольствием растущего населения планеты, создание пригодных

для жизни городов и развитие транспорта. В то же время количество пластиковых отходов слишком велико. Согласно статистике PlasticsEurope с 1950 по 2015 год 4,9 миллиарда тонн пластика оказались на свалках и в окружающей среде, что составляет около 80% от общего объема отходов (6,3 миллиарда тонн). Без контрмер к 2040 году пластиковые отходы могут увеличиться еще на 1,3 миллиарда тонн. Эти проблемы вызваны слабой развитостью систем по управлению отходами и их переработки. Так, только 8,6 млрд из 100 млрд тонн ресурсов, использованных в мировой экономической системе в 2020 году, были переработаны (PlasticsEurope, 2021). Поэтому разработка инновационных подходов к утилизации пластиковых отходов является актуальной задачей.

Количество микроорганизмов, разлагающих в природе полимерные промышленные материалы, такие как пластик, стремительно растет, что позволяет исследовать ферменты, которые за это отвечают, а также выделять наиболее активные из них. Предполагаемые деструкторы высокомолекулярных полимеров распространены как среди бактерий, так и среди грибов (Carr et al., 2020). Такие организмы способны разрушать пластик за счет ферментов гидролаз, которые расщепляют сложноэфирную связь. В настоящее время известно несколько групп гидролаз, отличающихся избирательностью в отношении субстратов: кутиназы, эстеразы, липазы. Некоторые из них могут разрушать неспецифичные субстраты – полимеры, имеющие в составе сложноэфирные связи, в том числе пластики, например, поликапролактон (ПКЛ) и полиэтилентерефталат (ПЭТ). Некоторые из таких гидролаз, за счет мутаций из-за обитания бактерий в среде с ПЭТ, стали специфичны к ПЭТ, такие ферменты называются ПЭТазами. С момента их открытия многие передовые лаборатории занимаются изучением их структурно-функциональных особенностей, позволяющих оптимизировать процесс переработки ПЭТ (Menziani et al., 2021).

В настоящей работе проведён широкий скрининг микроорганизмов с гидролазной активностью среди грамположительных почвенных бактерий в ходе твердофазного и погруженного культивирования. Отобраны наиболее перспективные бактерии родов *Streptomyces* и *Bacillus*, способные разрушать промышленные полимерные соединения. Оптимизированы условия погруженного культивирования бактерий с целью повышения гидролазной активности с использованием различных природных и искусственных полимерных соединений в качестве единственного источника углерода и энергии (Твин 20, Твин 80, оливковое масло), а также с варьированием их концентрации. Исследована субстратная избирательность продуцированных бактериями гидролаз культуральной жидкости с использованием *n*-нитрофенил ацетата, *n*-нитрофенил октаноата и додеканоата, содержащих в своей структуре сложноэфирную связь, бензольное кольцо и углеродные цепи разной длины.

Осуществлен скрининг наиболее активных продуцируемых бактериями гидролаз с ПКЛ. Показана максимальная активность гидролаз бактерии *Streptomyces rochei*. Предположено, что для продукции искомых гидролаз бактерии *S. rochei* с активностью в отношении пластика требуются полимерные соединения с более длинной углеродной цепью в качестве единственного источника углерода и энергии.

С помощью молекулярно-биологических методов подтверждено наличие генов, кодирующих ферменты с потенциальной ПЭТазной активностью, у трех бактерий рода *Streptomyces* и проведён их филогенетический анализ в сравнении с известными последовательностями генов, кодирующих активные в отношении ПЭТ ферменты.

## Литература


1. *Carr C.M., Clarke D.J. and Dobson A.D.W.* (2020) Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. Front. Microbiol. 11:571265.doi: 10.3389/fmicb.2020.571265.
2. *Menziani M.C., Berselli A., and Ramos M.J.* (2021) Novel PET-degrading enzymes: structure-function from a computational perspective, ChemBioChem 10.1002/cbic.202000841
3. https://plasticseurope.org/knowledge-hub/, Plastics – the Facts 2020 An analysis of European plastics production, demand and waste data.

# Характеристика штамма Pseudomonas putida CT3, обладающего уникальной способностью к деградации epsilon-капролактама, толуола и мета-ксилола

*Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Анохина Т.О.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино,
das3534@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38015

Микробная деградация играет существенную роль в процессах детоксикации устойчивых поллютантов, попадающих в окружающую среду в результате практической деятельности человека. Способность к деградации широкого спектра органических соединений, в том числе, токсичных ксенобиотиков, особенно характерна для бактерий рода *Pseudomonas*. Многие природные штаммы псевдомонад несут плазмиды биодеградации, которые, как правило, детерминируют расщепление одного типа соединений. Ранее нами было показано, что способность бактерий рода *Pseudomonas* утилизировать токсичное неприродное соединение *epsilon*-капролактам (далее капролактам, КАП, используется для производства нейлона) детерминируется плазмидами (CAP плазмидами), которые содержат генетическую информацию, необходимую для его полной минерализации [1].

В условиях комплексного загрязнения почв совмещение у микроорганизмов нескольких катаболических оперонов в составе одного мобильного генетического элемента обеспечивает конкурентное преимущество их обладателям. Ранее были выделены плазмидосодержащие штаммы псевдомонад, способные утилизировать капролактам и салицилат в качестве единственных источников углерода и энергии. Впервые был описан новый тип плазмид биодеградации КАП (CAP/SAL плазмиды), в составе которых содержится второй катаболический оперон, детерминирующий утилизацию салицилата – центрального метаболита окисления многих ароматических соединений [2].

В данном исследовании из активного ила городских очистных сооружений (г. Пущино, Моск. обл.) был выделен бактериальный штамм CT3, обладающий уникальной способностью разлагать одновременно капролактам, а также толуол и *мета*-ксилол в качестве единственных источников углерода и энергии. Цель работы – изучение генетического контроля деградации этих токсичных антропогенных соединений у штамма CT3.

При выделении бактерий использовали минеральную среду M9 с КАП (1.0 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Секвенирование и филогенетический анализ гена 16S рРНК (1407 п.н.) выделенного штамма позволил отнести его к виду *Pseudomonas putida*. Уровень сходства гена 16S рРНК с последовательностью аналогичного гена типового штамма *P. putida* DSM 291 составил 100%. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма *P. putida* CT3 помещена в GenBank под номером MH553084.

Как было сказано выше, деградация КАП у бактерий *Pseudomonas* контролируется CAP плазмидами. Известно о существовании единственного пути разложения КАП. Что касается толуола (метилбензол, ТОЛ), то описано пять возможных путей его расщепления у бактерий. Для флуоресцирующих псевдомонад, к которым относятся штаммы *P. putida*, в том числе, и выделенный нами штамм CT3, наиболее характерны два пути разложения толуола: TOL-путь, на начальных этапах которого происходит окисление боковой метильной группы под действием толуолмонооксигеназы, и TOD-путь, у которого трансформация толуола начинается с дигидроксилирования ароматического кольца толуолдиоксигеназой [3]. В связи с этим у штамма *P. putida* CT3 был проведен ПЦР-анализ ключевых генов *xyl*M (TOL-путь, ожидаемый ПРЦ-продукт размером 570 п.н.) и *tod*C1 (TOD-путь, ожидаемый ПРЦ-продукт – 625 п.н.), кодирующих синтез толуолмонооксигеназы и толуолдиоксигеназы соответственно. В качестве положительного контроля использовали штаммы *P. putida* TOL25 (разложение толуола по TOD-пути) и *P. putida* TOL8 (TOL-путь разложения толуола). В результате амплификации целевых генов ПЦР-продукт был получен только для *xyl*M, его размер соответствовал ожидаемому и составлял 570 п.н. Таким образом, был сделан вывод о том, что штамм *P. putida* CT3 окисляет толуол по TOL-пути.

Принимая во внимание тот факт, что до сих пор не описано ни одного бесплазмидного штамма-деструктора КАП, а разложение толуола по TOL-пути у бактерий детерминируется, как правило, TOL плазмидами [4], мы предположили, что деградация капролактама, толуола и *мета*-ксилола у штамма СТ3 может контролироваться плазмидными генами. Для выявления плазмид у исследуемого штамма был применен метод пульс-электрофореза геномной ДНК. Было показано, что в клетках *P. putida* СТ3 содержится мегаплазмида размером около 550 т.п.н. Для того, чтобы подтвердить плазмидную детерминацию признаков деградации КАП и/или ТОЛ был осуществлен конъюгационный перенос мегаплазмиды в бесплазмидный реципиентный штамм *P. putida* KT2442 (*gfp*, $Km^R$, $Rif^R$). Селекцию трансконъюгантов проводили на минеральной среде с КАП или ТОЛ в качестве единственного источника углерода и энергии. В результате проведенных экспериментов колонии трансконъюгантов были получены только на среде с капролактамом, при этом они не утилизировали толуол и *мета*-ксилол. Дальнейший анализ $CAP^+$ трансконъюгантов показал присутствие в них плазмидной ДНК, по размеру идентичной плазмиде, содержащейся в донорном штамме. Многократные попытки получить трансконъюганты на среде с ТОЛ не увенчались успехом.

Таким образом, в данной работе было получено доказательство плазмидной локализации генов деградации КАП у штамма *P. putida* СТ3, обладающего уникальной способностью к деградации капролактама, толуола и *мета*-ксилола. Что касается генов, детерминирующих разложение толуола и *мета*-ксилола, которые до сих пор были описаны только в составе TOL плазмид, по всей вероятности, у данного штамма они локализованы на хромосоме.

## Литература


1. *Есикова Т.З., Волкова О.В., Таран С.А., Боронин А.М.* Ключевая роль *dca*-генов в катаболизме *epsilon*-капролактама у бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 616–619.
2. *Панов А.В., Волкова О.В., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Кошелева И.А., Боронин А.М. scp*A – новый ген салицилатгидроксилазы, локализованный на плазмидах деградации салицилата/капролактама // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. С. 116–123.
3. *Cao B., Nagarajan K., Loh K.C.* Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 85. P. 207–228.
4. *Sentchilo V.S., Perebituk A.N., Zehnder A.J.B., Meer J.* Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2842–2852.


# Разработка систем экспрессного контроля и деградации додецилсульфата натрия на основе электрооптического датчика и грамотрицательных микроорганизмов Herbaspirillum lusitanum P6-12


*Жданова Е.С.[1], Каневский М.В[1], Величко Н.С.[2]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, dla_lisa@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38016


Прогресс научных и промышленных исследований в парфюмерно-косметической, химической, фармацевтической областях промышленности приводит к синтезу новых соединений, оказывающих несомненное влияние на антропоэкологические системы, изменяя качество природной среды и ее ресурсов. На данный момент в мире остро стоит проблема загрязнения окружающий среды побочными продуктами производств, в частности поверхностно-активными веществами (ПАВ). К приоритетным ксенобиотикам относят класс анионных ПАВ, представляющих собой линейные алкилбензолсульфонаты и алкилсульфаты [1]. Одним из крупномасштабно применяемых в промышленности сурфактантов, благодаря своим свойствам и низкой себестоимости, является додецилсульфат натрия (SDS). Для минимизации

возрастающего воздействия ксенобиотиков на внешнюю среду необходима оптимизация их отслеживания и разложения. Основными требованиями к методикам, используемым в экологическом мониторинге ПАВ и их удалении из сточных вод, являются специфичность, чувствительность и точность. Существуют различные способы очистки вод от ПАВ, основанные на механических, физико-химических химических, тепловых, электрохимических и биохимических процессах [2–4]. Однако все они не позволяют эффективно решать поставленную задачу.

Бактерии являются единственной группой организмов, которые вносят вклад в разрушение ПАВ в окружающей среде. Огромное значение для минимизации воздействия ПАВ на биосферу является изучение их детекции и биодеградации с применением микроорганизмов. Данный метод наиболее экономичен и эффективен, и отличается экологической безопасностью [5, 6].

Показана возможность деградации SDS грамотрицательными микроорганизмами рода *Herbaspirillum*. Для исследований был выбран типовой штамм *H. lusitanum* P6-12 (IBPPM 515; http://collection.ibppm.ru/), благодаря его высокой приспособляемости к различным условиям окружающей среды [7]. *H. lusitanum* P6-12 выращивали в жидкой синтетической среде с добавлением следующих концентраций SDS: 0,2, 0,4 и 0,6 г/л, в качестве единственного источника углеводов и энергии в течение 5 суток при 30±1 °C. Оптическая плотность стартовой культуры составляла $A_{600}$ ~ 0,1, что соответствовало $1{,}2\times10^9$ клеток $мл^{-1}$. На пятые сутки был отмечен рост культуры при наличии в среде 0,2 и 0,4 г/л SDS и отсутствие роста при 0,6 г/л SDS в среде культивирования.

Концентрацию SDS в среде культивирования измеряли методом анализа активного вещества в присутствие метиленового синего спустя 5 суток [8]. Наибольший процент деградации SDS составил 43,8% при концентрации 0,2 г/л. Было обнаружено, что при увеличении концентрации SDS до 0,4 и 0,6 г/л эффективность разложения снижается до 21,9% и 3,7% соответственно.

Для оценки влияния SDS на микробные клетки использовали метод электрооптического анализа (ЭО) клеточных суспензий. Была показана возможность использования *H. lusitanum* P6-12 для выявления малых концентраций SDS с помощью оценки изменений электоориентационных спектров. Исследование ЭО свойств клеток, выращенных в присутствии SDS, может показать не только сам факт влияния ПАВ на микроорганизмы, но и (по изменению величины ЭО параметров) оценить воздействие соединения на микробные клетки количественно. Установлено, что в исследуемом диапазоне частот: 50, 100, 200, 400, 500, 700, 1000, 2000 и 3000 кГЦ регистрируются изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток после культивирования с SDS, по сравнению с контролем.

Бактерии *H. lusitanum* P6-12 имеют потенциал как деструкторы SDS, а также выступают в роли биоиндикаторы, позволяя определять малые концентрации додецилсульфата натрия.

## Литература


1. *Rosety, M.; Ordonez, F.J.; Rosety, R.M.; Rosety, J.M.; Rosety, I.; Carrasco, C.; Ribelles, A.;* Comparative study of the acute toxicity of anionic surfactants alkyl benzene sulfonate (ABS) and sodium dodecyl sulfate (SDS) on gilthead, *Sparus aurata L.*, eggs // Histology and. Histopathology. – 2001. – 4, 1091e1095.
2. *Boonyasuwat. S.; Chavadej, S.; Malakul, P.; Scamehorn, J.F.* Anionic and cationic surfactant recovery from water using a multistage foam fractionator // Chem. Eng. J. – 2003. – 93, 241–252.
3. *Panizza, M.; Barbucci, A.; Delucchi, M.; Carpanese, M.P.; Giuliano, A.; Cataldo-Hernandez, M.; Cerisola, G.* Electro-Fenton degradation of anionic surfactants // Sep. Purif. Technol. – 2013. – 118, 394–398.
4. *Ramprasad, C.; Philip, L.;* Contributions of various processes to the removal of surfactants and personal care products in constructed wetland // Chem. Eng. J. – 2018. – 334, 322–333.
5. *Van Ginkel, C.G.* Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms // Biodegradation. – 1996. – 7, 151–164.
6. *Caracciolo, A.B.; Cardoni, M.; Pescatore, T.; Patrolecco L.* Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling // Environ. Pollut. – 2017. – 226, 94-103.
7. *Weiss, V.A.; Faoro, H.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Raittz, R.T.; de Souza, E.M.; Monteiro, R.A., et al.* Draft genome sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an endophyte isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. – 2012. – 194, 4136–4137.
8. *Shukor, M.Y.; Husin, W.S.W.; Rahman, M.F.A.; Shamaan, N.A.; Syed, M.A.* Isolation and characterization of an SDS-degrading *Klebsiella oxytoca*. // J. Environ. Biol. – 2009. – 30,129–134.

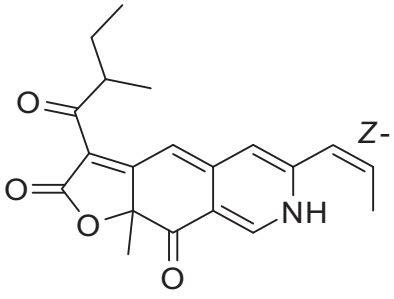
# Особенности образования монасникотиновой кислоты грибом *Aspergillus cavernicola*

*Желифонова В.П.[1], Антипова Т.В.[1], Зайцев К.В.[2], Баскунов Б.П.[1], Козловский А.Г.[1]*

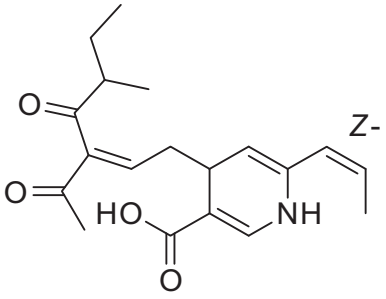
[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
tatantip@rambler.ru
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38017

Природные пищевые красители все больше привлекают внимание у потребителей по сравнению с синтетическими красителями из-за потенциального вредного воздействия последних. Большинство используемых в промышленности натуральных красителей получают непосредственно из природных источников, например бетанин (экстракт корня свеклы *Beta vulgaris*) или ликопин (экстракт томата *Solanum lycopersicum*). Их производство сильно зависит от поставки сырых ингредиентов, что подвержено сезонным колебаниям, как в отношении количества, так и качества. Эти ограничения можно преодолеть изучением новых источников природных пигментов, таких как микроорганизмы. Известно, что грибы образуют и экскретируют различные классы вторичных метаболитов, включая пигменты различной окраски. *Monascus* – это грибы, продуцирующие пигменты, которые издавна использовались в традиционных продуктах питания в странах Юго-Восточной Азии. Пигменты *Monascus* представляют собой смесь азафилоновых соединений, имеющих желтый, оранжевый и красный цвета (Chen et al., 2020). Образование красных пигментов, содержащих в своей структуре азот, обнаружено у грибов других таксонов (Pimenta et al., 2021). Многообещающим и безопасным источником природных красных пигментов могут быть грибы вида *Aspergillus cavernicola*. У этих грибов были обнаружены красный пигмент кавернамин и его предшественник, оранжево-желтый пигмент кавернин (Petersen et al., 2020). Кроме того, у одного из штаммов *A. cavernicola* был выделен метаболит – монасникотиновая кислота (**МНК**), молекулярная структура которой имела сходство с *цис*-кавернамином (**КАВ**) (Antipova et al., 2018). Изучение противоопухолевой активности **МНК** показало, что она снижает пролиферацию и миграцию клеток рака простаты LnCaP и ингибирует сигнальные пути AKT-mTORC1 и FAK-Src (Рысцов и др., 2021). МНК является перспективным соединением для получения различных производных с более высокой степенью противоопухолевой активности. Таким образом, дальнейшее изучение вторичных метаболитов, продуцируемым штаммом *A. cavernicola* ВКМ F-906, и определение условий их синтеза представляет несомненный интерес для биотехнологии и медицины.




цис-Кавернамин (**КАВ**)




Монасникотиновая кислота (**МНК**)

Изучение экстрактов культуральной жидкости *A. cavernicola*, выращенных в средах с аммонием и различными источниками углерода, показало наличие в преобладающих количествах темно-красного пигмента и МНК. Желтые и оранжевые пигменты присутствовали в незначительных количествах. Внутри клеток были обнаружены только оранжевые и желтые пигменты. Эти результаты свидетельствовали, что МНК и красный пигмент образуются вне клеток продуцента, а желтые и оранжевые пигменты син-

тезируется в мицелии, а затем экскретируются в среду. Красный метаболит был выделен в чистом виде, его структура установлена с помощью масс-спектрометрии и мультиядерной спектроскопии ЯМР. Физико-химические характеристики метаболита соответствовали *цис*-кавернамину (**КАВ**). Было показано, что штамм способен продуцировать **КАВ** и **МНК** при росте в средах, содержащих $NH_4^+$ как источник азота. В среде с $NO_3^+$ в экстракте были обнаружены только оранжевые и желтые пигменты. Но при внесении 3.5 мМ $(NH_4)_2SO_4$ к культуральной жидкости *A. cavernicola* происходило образование **КАВ**. Таким образом, было установлено, что **КАВ** образуется вне клеток продуцента из оранжевых пигментов в присутствии $NH_4^+$, как у *Monascus*. Поддержание pH среды в процессе роста гриба в значениях 6.1–6.5 привело к увеличению продукции **КАВ** и **МНК** в 1.8 и 1.6 раза, соответственно. Исходя из образования этих метаболитов в процессе роста гриба, а также учитывая их структуры, было высказано предположение, что **МНК** является продуктом ферментативного или химического разложения **КАВ**. В опытах *in vitro* было показано, что **МНК** синтезируется из **КАВ** в результате химических реакций без участия ферментов. Скорость разложения **КАВ** была пропорциональна начальной концентрация **КАВ** в буфере и имела одинаковые константы скорости реакции. Установлено, что скорость разложения КАВ в буфере была ниже в 1.8 раза при pH 4.3 по сравнению с pH 6.5. На скорость образования **МНК** начальная концентрация **КАВ** и значения pH буфера не влияли. В результате проведенной работы были определены основные условия образования **МНК** и **КАВ**.

## Литература


1. *Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zherebker A.Ya., et al.* Monasnicotinic acid, a novel pyridine alkaloid of the fungus Aspergillus cavernicola: isolation and structure elucidation. Mendeleev Commun. 2018. 28: 55–57. doi: 10.1016/j.mencom.2018.01.018
2. *Chen Ch., Tao H., Chen W., Yang B., Zhou X., Luo X., Liu Y.* Recent advances in the chemistry and biology of azaphilones. RSC Adv., 2020. 10: 10197-10220. doi:10.1039/D0RA00894J
3. *Petersen T.I., Kroll-Moller P., Larsen T.O., Odum A.S.R.* A novel class of pigments in aspergillus. 2020. Patent N WO2020094830
4. *Pimenta L.P.S., Gomes D.C., Cardoso P.G., Takahashi J.A.* Recent findings in azaphilone pigments J. Fungi 2021, 7(7): 541. https://doi.org/10.3390/jof7070541
5. *Рысцов Г.К., Антипова Т.В., Зайцев К.В., Земскова М.Ю.* Противоопухолевая активность монасникотиновой кислоты, выделенной из гриба *Aspergillus cavernicola.* Биоорганическая химия. 2021. 47(1): 162–172. doi: 10.31857/s0132342321010206.


# Оценка потенциальной фосфат-мобилизующей способности штаммов *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas fluorescens* ПГ7 при культивировании на элективных питательных средах in vitro


*Калинина Т.В., Железняков С.В., Деева В.К., Попова Т.А., Лактионов Ю.В., Якоби Л.М.*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» РАН, г. Санкт-Петербург, sotvk@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38018


Существует потребность в улучшении фосфорного питания сельскохозяйственных растений за счет мобилизации фосфора из его труднодоступных соединений почвы и удобрений ризосферными микроорганизмами. Для решения этой проблемы ведется селекция фосфат-мобилизующих бактерий – продуцентов биопрепаратов удобрительного действия. Знания о фосфат-мобилизующей способности штаммов бактерий, которые входят в состав уже готовых биопрепаратов стимулирующего и/или защитного действия, также необходимы; они послужит научно-обоснованному (рациональному) применению таких биопрепаратов.

В задачу настоящего исследования входило оценить потенциальную способность двух штаммов бактерий, *Agrobacterium radiobacter* 10 и *Pseudomonas fluorescens* ПГ7, дефосфорилировать неорганические и органические фосфаты. Первый из них обладает ростостимулирующим действием для многих видов сельскохозяйственных растений и является основой коммерческого биопрепарата «Агрофил»; второй, проявляет хорошую биоконтрольную функцию и проходит испытания в географической сети опытов.

Исследование проводили путем культивирования бактерий на элективных плотных питательных средах при 28 °С, а также на элективных жидких питательных средах при 28 °С и 38 °С. Исследование, проведенное на плотных средах, таких как NBRIP с трикальций фосфатом (1), глюкозо-аспарагиновой с гидроксилапатитом (по Муромцеву) (2) и PSM с фитатом кальция (3), показало, что *P. fluorescens* шт. ПГ7 способен растворять неорганические фосфаты и фитин, о чем свидетельствовало образование зон гало вокруг колоний; тогда как *A. radiobacter* шт. 10 такой способностью не обладает.

Исследование, проведенное на жидкой среде II с фитатом натрия (по Муромцеву) (2) показало, что *A. radiobacter* шт. 10 способна использовать его в качестве источника углерода и фосфора для роста и размножения как в условиях инкубации при 28 °С, так и при 38 °С; при этом наблюдается накопление иммобилизованного фосфора в биомассе и свободного ортофосфата в среде, что свидетельствует о проявлении фитазной активности штамма. В тех же условиях *P. fluorescens* шт. ПГ7 был не способен использовать фитат в качестве источника углерода и гидролизовать его с высвобождением свободного ортофосфата в среду.

Показано также, что в условиях культивирования штаммов на жидкой среде PSM с двумя источниками углерода, глюкозой и фитатом натрия при 28°С, как агробактерия, так и псевдомонада, проявляли фитазную активность и размножались, накапливая значительное количество иммобилизованного фосфора в биомассе. В то же время в условиях инкубации при 38 °С, только *A. radiobacter* шт. 10 сохранил способность расти на среде PSM. Как следует из литературных источников диапазон оптимальной температуры для роста *P. fluorescens* составляет около 25–30 °С. Таким образом, установленная в ходе эксперимента неспособность *P. fluorescens* шт. ПГ7 расти при температуре 38 °С не противоречит литературным данным и свидетельствует о его безопасности для человека.

Также по результатам проведенного исследования, было сделано заключение относительно выбора метода для оценки потенциальной фосфат-мобилизующей способности микроорганизмов. Так, способность штаммов к растворению минеральных и органических фосфатов целесообразно оценивать на плотных питательных средах. В свою очередь способность штаммов к мобилизацации фосфора из органических фосфатов необходимо оценивать не на плотных, а на жидких средах, во избежание получения ложноположительных результатов; при этом основными показателями способности штаммов к фосфат-мобилизации будут – содержание иммобилизованного фосфора в бактериальном осадке и свободного ортофосфата, выделенного в среду.

Далее, в условиях вегетационного опыта было исследовано влияние штаммов бактерий на урожай и общее содержание фосфора в соломе люцерны хмелевидной при моно- (бактерия, гриб арбускулярной микоризы) и двойной (бактерия + гриб арбускулярной микоризы) инокуляции. Полученные результаты обсуждаются.

*Работа выполнена на средства гранта РФФИ № 19-016- 00197-а.*

## Литература

1. *Nautiyal C.S.* An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170: 265-270 (https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x).
2. Методические указания по выделению микроорганизмов, растворяющих труднодоступные минеральные и органические соединения фосфора / Под ред. Г.С. Муромцева. ВНИИСМ. Ленинград, 1981.
3. *Sasirekha B., Bedashree T., Champa K.L.* Optimization and partial purification of extracellular phytase from Pseudomonas aeruginosa p6. European Journal of Experimental Biology, 2012, 2 (1): 95-104.

# Биосинтез изолимонной кислоты из спиртсодержащих отходов с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*

*Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А., Моргунов И.Г.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН); kamzolova@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38019

В последние годы (2*R*,3*S*)-изолимонная кислота (ИЛК) рассматривается перспективным препаратом для профилактики и лечения многих социально значимых заболеваний. ИЛК доказала свою эффективность в отношении железодефицитной анемии, рассасывания тромбов и болезни Паркинсона. В форме лактона ИЛК используется для синтеза противоопухолевых препаратов (Aurich et al., 2012). Изоцитрат калия используется для синтеза дарунавира и бреканавира для лечения ВИЧ и профилактики СПИД (Moore et al., 2017). Мы обнаружили, что ИЛК обладает мощной антиоксидантной активностью и защищает организмы от различных токсичных соединений (Cu, Pb, Zn, Cd, $H_2O_2$) (Morgunov et al., 2018); снимает нейроинтоксикацию и восстанавливает пространственную память (Morgunov et al., 2019; 2020).

Сотрудниками ИБФМ РАН разработано несколько принципиально новых технологических процессов производства ИЛК с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica* с использованием очищенных источников углерода, такие как этанол, рапсовое масло, подсолнечное масло и глицерин. Однако высокая стоимость производства ИЛК из чистых субстратов определяет интерес к поиску дешевых и возобновляемых отходов.

Одним из перспективных субстратов для разработки процесса получения ИЛК с помощью *Y. lipolytica* могут стать побочные продукты спиртовых производств, такие как эфироальдегидная фракция (ЭАФ). ЭАФ содержит в своем составе этиловый спирт, а также целый ряд примесей, придающих ей характерный цвет и запах. Основную долю примесей составляют альдегиды, метанол, сложные эфиры низших спиртов и карбоновые кислоты. Содержание примесей невелико, однако их присутствие вызывают сильное раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей. ЭАФ из-за наличия примесей эфира и альдегидов находит применение только в лакокрасочной промышленности. В то же время основной компонент ЭАФ – этиловый спирт является прекрасным субстратом для биосинтеза ИЛК (Kamzolova et al., 2018; Morgunov et al., 2018, 2019). Поскольку очистка ЭАФ требует значительных затрат, использование этого побочного продукта для биосинтетического получения ИЛК имеет большое экологическое и экономическое значение.

Целью данной работы являлось изучение возможности биосинтеза ИЛК из ЭАФ у дрожжевых организмов, отбор продуцента и определение условий его культивирования, обеспечивающих повышенный и направленный синтез продукта.

Объектами исследования служили 35 природных штаммов дрожжей различных родов и видов и мутантные и рекомбинантные штаммы дрожжей *Y. lipolytica* из коллекции лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН. Установлено, что большинство исследуемых штаммов (26 из 35) обладали способностью синтезировать ИЛК (0.06–5.51 г/г клеток) при росте на ЭАФ в условиях дефицита азота. Однако количество ИЛК у исследуемых дрожжей было различно: 8 штаммов синтезировали ИЛК в количестве до 0.1 г/г клеток, 8 штаммов – от 0.1 до 0.5 г/г клеток, 2 штамма – от 0.5 до 1 г/л; 3 штамма – от 1 до 2 г/л; 2 штамма – от 2 до 3 г/л и 3 штамма – природный штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, мутант *Y. lipolytica* УФ/ННГ и рекомбинантный штамм *Y. lipolytica ACO1* обладали максимальной эффективностью биосинтеза ИЛК (5.51; 4.61 и 3.73 г/г клеток, соответственно). Наряду с ИЛК в условиях лимитирования роста клеток азотом накапливались другие интермедиаты метаболизма ЭАФ и ЦТК – уксусная кислота, лимонная кислота (ЛК), α-кетоглутаровая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота и фумаровая кислота. Большая часть штаммов, относящихся к виду *Y. lipolytica*, синтезировали преимущественно ИЛК (32.3–53.5% от общего количества кислот) и ЛК. Следует отметить, что мутант *Y. lipolytica* УФ/ННГ и рекомбинантный штамм *Y. lipolytica ACO1* (№ 20) характеризовались сниженной долей ИЛК в общем пуле синтезируемых кислот (44.6 и 45.3%, соответственно) по сравнению с природным штаммом *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 (53.5%).

Природный штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 с максимальным накоплением кислоты (5.51 г/г клеток и 53.5% от суммы кислот) был отобран для дальнейшей работы в качестве перспективного продуцента ИЛК из ЭАФ.

Установлено, что у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 при росте в полноценной среде с ЭАФ образования кислот не происходит. Необходимым условием образования ИЛК из ЭАФ является лимитировании роста продуцента с помощью источника азота. Кроме того, природа источника азота оказывала существенное влияние на рост продуцента и процесс кислотообразования. В средах с $KNO_3$ и $NaNO_3$ рост отсутствовал; максимальный рост клеток (2.35 г/л) наблюдался в среде с мочевиной и снижался в 2 раза в среде с сульфатом аммония (1.33 г/л) и ацетатом аммония (1.19 г/л). Напротив, максимальное накопление ИЛК (6.33 г/л) наблюдалось в среде с $(NH_4)_2SO_4$. Использование $NH_4Cl$ и $NH_4NO_3$ приводило к снижению синтеза ИЛК на 21 и 30%, соответственно, а ацетата аммония – в 3 раза по сравнению с $(NH_4)_2SO_4$. Мочевина ($(NH_2)_2CO$) обеспечивала также хороший синтез ИЛК (5.9 г/л). Соотношение ИЛК/ЛК варьировало от 1.2:1 до 1.7:1 в зависимости от источника азота; максимальный сдвиг кислотообразования в сторону синтеза ИЛК (1.7:1) и максимальный выход продукта ($Y_{ИЛК}$) (0.32 г/г) отмечался в среде с $(NH_4)_2SO_4$.

Процессы роста *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 и кислотообразования зависят от pH среды. Хороший рост продуцента наблюдался при pH = 4–6.5, в то время как для интенсивного синтеза ИЛК необходимо поддерживать pH на уровне 6.0–6.5.

Установлено, что от концентрации ЭАФ зависит качественный и количественный состав накапливаемых продуктов. При остаточной концентрации ЭАФ до 1 г/л *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 синтезировали равные количества ИЛК и ЛК (ИЛК:ЛК = 1:1), содержание уксусной кислоты не превышало 0.5 г/л. При увеличении концентрации ЭАФ от 1 до 4 г/л, синтез ИЛК увеличивался с 51.5 до 60.7 г/л, при этом синтез ЛК подавлялся с 51.3 до 31.3 г/л. Дальнейшее повышение концентрации этанола с 4 до 6 г/л приводит к незначительному снижению как ИЛК, так и ЛК (до 54.1 и 27.0 г/л). При концентрации ЭАФ, равной 10 г/л, синтез ИЛК и ИЛК был ингибирован и в среде накапливалась уксусная кислота (12 г/л). Максимальные показатели продуктивности синтеза ИЛК ($Q_{ИЛК}$) (0.89 г ИЛК/л·ч) и выхода продукта ($Y_{ИЛК}$) (0.61 г/г) наблюдались при подпитке, равной 4 г/л ЭАФ.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования отходов спиртовых производств (ЭАФ) в качестве источника углерода и энергии для получения ИЛК дрожжами *Y. lipolytica*. Комбинируя различные факторы культивирования и состав питательной среды, можно регулировать процесс кислотообразования и достичь высокой концентрации ИЛК.

## Литература


1. *Aurich et al.* In: Wang, X., Chen, J., Quinn, P. (Eds.), Reprogramming microbial metabolic pathways. Springer, Dordrecht, 2012, pp. 391–424.
2. *Moore et al.* Org. Process Res. Dev. 2017, 21, 98–106.
3. *Morgunov et al.* Prep. Biochem. Biotechnol. 2018, 48, 1-5.
4. *Morgunov et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019, 103, 3549-3558.
5. *Morgunov et al.* Microorganisms 2020, 8(4), doi: 10.3390/microorganisms8040462.


# Выделение из высокомагнитной почвы марганецокисляющих микроорганизмов и оценка уровня их устойчивости к марганцу


*Касаткина М.А., Нгун К.Т., Плешакова Е.В.*

Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, milena.kasatkina22@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38020


К опаснейшим загрязнителям природных вод относят тяжёлые металлы. Они обладают персистенцией, общетоксичностью, способностью к биоаккумуляции, могут оказывать мутагенное и канцероген-

ное воздействие на живые организмы (Su et al., 2014). Многие водные объекты, расположенные вблизи промышленных предприятий, постоянно подвергаются сильной техногенной нагрузке, в них нередко наблюдается превышение ПДК различных тяжёлых металлов, в том числе, марганца. Известно, что избыток марганца в питьевой воде оказывает общерезорбтивное и специфическое повреждающее действие на ЦНС, желудочно-кишечный тракт, почки, иммунную, кровяную и костную систему, снижает активность антиоксидантной системы и обменных процессов.

В условиях современного мира предъявляются повышенные требования к качеству воды и содержанию в ней допустимых концентраций тяжёлых металлов, что требует модернизации уже существующих или поиска новых экологически безопасных и экономически выгодных способов очистки. Доступными и инновационными считаются в настоящее время биотехнологические способы с использованием микроорганизмов (Mosa et al., 2016). Известны микроорганизмы, способные ферментативно окислять двухвалентные соединения марганца или осаждать их на поверхности микробной клетки (De Schamphelaire et al., 2007; Sujith et al., 2011). Поэтому биологический потенциал марганецокисляющих микроорганизмов целесообразно использовать для снижения избыточного содержания данного элемента в водных экосистемах и в очищаемых сточных водах.

Целью настоящей работы было определение устойчивости микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, к присутствию в среде ионов Mn (II) в диапазоне концентраций. На основе проведённых скрининговых исследований предполагалось выявление микробных штаммов с максимальной устойчивостью. Марганецокисляющие микроорганизмы выделяли из почвенных микробоценозов г. Медногорска (Оренбургская область, Россия). Почвы города Медногорска (урбанозёмы с нейтральной реакцией среды) загрязнены промышленными выбросами медно-серного комбината: медью, железом, марганцем и соединениями серы. Почвенные пробы, из которых изолировали микроорганизмы, характеризовались максимальной степенью техногенной нагрузки и чрезвычайно высоким уровнем магнитной восприимчивости. Выделение нейтрофильных марганецокисляющих микроорганизмов проводили на агаризованной селективной среде, г/л: $MnSO_4 \times 5H_2O$ – 4,72; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5; $NaNO_3$ – 0,5; $K_2HPO_4$ – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; лимонная кислота – 10,0, сахароза – 2,0, пептон – 1,0; pH 7,0 (Granina et al., 2003). На поверхности селективной среды появлялись характерные колонии, рост которых сопровождался накоплением тёмно-бурых окислов марганца. По мере роста и развития колоний используемая среда меняла цвет, постепенно окисляясь от бежевого до коричневого. Из изолированных марганецокисляющих микроорганизмов была создана лабораторная коллекция штаммов, хранящихся при 4 °С на столбиках 6%-ной агаризованной селективной среды под стерильным вазелиновым маслом с регулярными пересевами.

В ходе дальнейших экспериментов мы определили устойчивость одиннадцати микробных штаммов к действию диапазона концентраций Mn (II): 0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250 ммоль/л) по способности исследуемых микроорганизмов к росту на агаризованной LB-среде, содержащей Mn (II). Результаты эксперимента продемонстрировали, что большинство из исследованных нами микроорганизмов отличались повышенной устойчивостью к марганцу. Для оценки уровня индивидуальной металлоустойчивости микробных штаммов мы рассчитали максимально-толерантные и минимально-ингибирующие концентрации (МТК и МИК) Mn (II) (таблица). Максимальной устойчивостью к Mn (II), как показали эксперименты, обладали микробные штаммы 55.2 и 69.5.

*Таблица*

**МТК и МИК исследованных микробных штаммов**

| Показатели | Микробные штаммы | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 55.1 | 55.2* | 55.7 | 55.5 | 55.8 | 13.1 | 13.2 | 13.3 | 13.4 | 69.3 | 69.5* |
| МТК, ммоль/л | 150,0 | 250,0 | 3,0 | 1,5 | 0,2 | 20,0 | 200,0 | 15,0 | 200,0 | 200,0 | 250,0 |
| МИК, ммоль/л | 200,0 | – | 4,0 | 2,0 | 0,5 | 25,0 | 250,0 | 20,0 | 250,0 | 250,0 | – |

*Примечание*: * – данный штамм хорошо рос при концентрации Mn (II) 250 ммоль/л, при бóльших концентрациях рост не изучали.

В ходе дальнейших исследований изучили динамику роста микробного штамма 55.2 в жидких средах: питательной LB-среде и селективной среде для марганецокисляющих микроорганизмов, содержащих

возрастающие концентрации Mn (II): 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 ммоль/л. В качестве посевного материала использовали смыв суточной микробной культуры с агаризованной среды стерильным физиологическим раствором. Оптическая плотность исходной посевной дозы составляла 0,2 ед. при $\lambda = 440$ нм. В качестве контроля использовали жидкие среды для культивирования без микроорганизмов. Каждый вариант был изучен в 3-х повторностях. Показатели роста определяли спектрофотометрически через 5 суток культивирования микробного штамма при 28 °С. Было установлено, что наиболее активный рост штамма 55.2 происходил в LB-среде при концентрации Mn (II) 5 ммоль/л, в селективной среде для марганецокисляющих микроорганизмов – 10 ммоль/л (оптическая плотность увеличилась в 6,8 и 8,2 раза соответственно). В селективной среде наблюдался прирост биомассы исследованного микроорганизма при всех изученных концентрациях марганца. Результаты проведённых экспериментов указывают на возможные перспективы использования микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, в биотехнологиях очистки воды от избыточного содержания в ней Mn (II).

## Литература


1. *Su C.* A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: situation, impact and remediation techniques / C. Su, Q.L. Jiang, W.J. Zhang // Environ. Skeptics and Critics. – 2014. – V. 3, N 2. – P. 24–38.
2. *Mosa K.A.* Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids / K.A. Mosa, I. Saadoun, K. Kumar, O.P. Dhankher // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 1–14.
3. *De Schamphelaire, L.* Minireview: the potential of exchanged manganese redox cycling for sediment oxidation / L. De Schamphelaire, K. Rabaey, N. Boon, W.Verstraete, P. Boeckx // Geomicrob. J. – 2007. – V. 24, N 7-8. – P. 547–558.
4. *Sujith, P.P.* Manganese oxidation by bacteria: biogeochemical aspects / P.P. Sujith, P.A. Loka Bharathi // Molecular biomineralization. Progress in molecular and subcellular biology. V. 52 / Ed: W. Müller. – Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2011. – P. 49–76.
5. *Granina L.Z.* On iron and manganese oxidizing microorganisms in sedimentary redox cycling in lake Baikal / L.Z. Granina, V.V. Parfenova, T.I. Zemskaya, Yu.R. Zakharova, L.P. Golobokova // Berliner Palaobiol. Abhandlungen. – 2003. – V. 4. – P. 121–128.


# Оптимизация температурных условий для синтеза ферментов дрожжами


*Кирюхина А.С.*

Иркутский национальный исследовательский технический университет, alexandra.kirukhina@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38021


В настоящее время актуальным является применение микроорганизмов в качестве продуцентов различных ценных продуктов – углеводов, витаминов, белков, ферментов и др. [1]. Особенный интерес представляют липолитические и протеолитические ферменты. Липолитические ферменты используются при производстве моющих средств, при обработке сырья в меховой промышленности, при производстве сыров в пищевой промышленности; перспективны для очистки жиросодержащих сточных вод [2]. Применение протеолитических ферментных препаратов актуально для удаления белковых помутнений в виноделии; для очистки крахмала от белков в крахмалопаточной промышленности, для ускорения процессов созревания теста и улучшения качества хлебобулочных изделий [3].

В качестве источника протеаз и липаз интересны растущие на этаноле дрожжи *Candida ethanolica*, т.к. синтетический этанол является доступным сырьем, хорошо растворимым в воде и нетоксичным [4]. Ранее было установлено, что штамм дрожжей *Candida ethanolica BKM Y-2300 T* является перспективным продуцентом протеолитических и липолитических ферментов [5, 6].

Одним из важнейших факторов, влияющих на эффективность микробиологического синтеза, является температура [7], поэтому целью данной работы был поиск оптимальной температуры для синтеза ферментов дрожжами *Candida ethanolica BKM Y-2300 T.*

Культивирование дрожжей осуществляли в течение 24 ч на питательной среде 9М [8] при содержании этанола 1,5 об.%, аэрации 200 об/мин, температурах 30 °С, 37 °С, 42 °С. Липолитическую активность определяли по [9], протеолитическую активность – по [10].

Наиболее высокую активность ферментов наблюдали после культивирования дрожжей при 37 °С: 155,0 Ед/мл к.ж и 98 Ед/мл к.ж для липаз и протеаз соответственно (табл. 1).

Степень увеличения липолитической активности при 37 °С через 24 ч культивирования составила 170%, при 30 °С и 42 °С – 90,5% и 45,5% соответственно. Протеолитическая активность при 37 °С возросла на 75%; при 42 °С – на 10,5%. После культивирования при 30 °С величина протеолитической активности дрожжей не изменилась (рис. 1).

*Таблица 1*

**Зависимость ферментативной активности дрожжей от температуры**

| Тип ферментативной активности | Температура культивирования, °С | Активность фермента до начала культивирования, Ед /мл к.ж | Активность фермента после окончания культивирования, Ед /мл к.ж |
|---|---|---|---|
| Липолитическая | 30 | 52,5±10 | 100,0±10 |
| | 37 | 57,5±7,5 | 155,0±10 |
| | 42 | 55,0±10 | 80,0±10 |
| Протеолитическая | 30 | 56,0±20 | 56,0±10 |
| | 37 | 56,0±20 | 98,0±20 |
| | 42 | 53,2±15 | 58,8±5 |

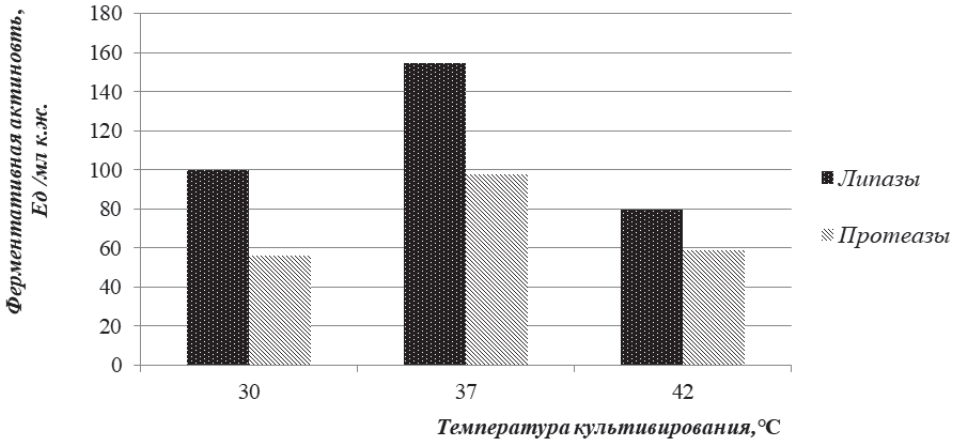



**Рис. 1.** Влияние температуры на ферментативную активность дрожжей Candida ethanolica после 24 ч культивирования

Таким образом, проведенные исследования показали, что для продуцирования протеаз и липаз дрожжами *Candida ethanolica BKM Y-2300 T* оптимальной является температура 37 °С.

## Литература


1. *Романова М.В.* Физиологическая и биохимическая характеристика термофильного штамма-продуцента внеклеточных протеаз *Bacillus velezensis* // Романова М.В., Белодед А.В. / Успехи в химии и химической технологии. 2020. Т. XXXIV. № 11. 80–82 с.
2. *Мамедова Л.В.* Методика скрининга штаммов-продуцентов липолитических ферментов // Мамедова Л.В., Пучкова Л.И., Лебедев Л.Р. / Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. № 10. 32–35 с.
3. *Перелыгин В.В.* Протеазы как вероятные факторы регуляции конкурентных отношений среди микроорганизмов // Перелыгин В.В., Похиленко В.Д., Левчук В.П., Калмантаев Т.А., Светоч Э.А. / Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2018. № 12 (часть 1). 98–102 с.
4. *Бравичева Р.Н., Сатрутдинов А.Д., Благодатская В.М.* Штамм дрожжей *Candida ethanolica* – продуцент биомассы // Патент РФ № 2061751. Опубл. 1998.

5. *Кирюхина А.С.* Возможность использования дрожжей *Candida ethanolica* в качестве продуцентов липотических ферментов // Кирюхина А.С., Лозовая Т.С. / Мировая наука 2021. Проблемы и перспективы развития. 2021. 66–69 с.
6. *Kiryuhina A.S. Candida ethanolica* yeast strain as the producer of proteolytic enzymes // Kiryuhina A.S., Lozovaya T.S. / XX International scientific–practical conference «The Strategies of Modern Science Development». 2021. P. 8–11.
7. *Чернявская М.И.* Экологическая микробиология : учеб. метод. пособие – Минск : БГУ, 2016 – 63 с.
8. *Кирюхина А.С.* Особенности аэробного культивирования *Candida ethanolica* // Кирюхина А.С., Привалова Е.А., Лозовая Т.С. / Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг. II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2018. 67–71 с.
9. *Чан Тхи Тху Хыонг.* Гидролиз и модификация липидов с применением липолитических ферментов дрожжей *Candida rugosa* и *Yarrowia lipolytica*: автореф. канд. тех. наук. Казань, 2013. 19 с.
10. *Карпенко Д.В.* Влияние нанопрепаратов на активность протеаз // Карпенко Д.В., Житков В.В., Карязин С.А. / Пиво и напитки, 2016, № 4, 46–49 с.

# Влияние внеклеточных лектинов на седиментационные свойства активного ила

*Клементьев С.В., Кобелев А.В., Сироткин А.С.*

ФГБОУ ВО «Казанский национальный технологический университет», slava_klementev3715@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38022

В литературе имеются данные об использовании растительного сырья в качестве природных коагулянтов (флокулянтов) [1], примером которых являются семена, богатые лектинами. Однако, затраты на получение очищенных растительных гликопротеинов являются существенными. В связи с этим, лектины бактерий представляют огромный интерес для их изучения.

Лектины – это белки и гликопротеины, способные узнавать и специфично связывать углеводные остатки на поверхности клеток, вызывая их агглютинацию [2]. Эти агглютины присутствуют во всех живых организмах и выполняют роль белково-углеводного узнавания в организме хозяина и в микробном сообществе в целом [3].

**Цель работы:** оценить способность внеклеточных бактериальных лектинов в качестве коагулянта для седиментации активного ила.

**Объекты исследования:** активный ил коммунально-бытовых очистных сооружений г. Зеленодольск Республика Татарстан;

*Bacillus subtilis* (получена из лекарственного препарата «Споробактерин» производитель – ООО «Бакорен»);

р. *Bacillus* (выделена из микробного сообщества активный ил очистных сооружений г. Зеленодольск и идентифицирована с помощью молекулярно-генетического метода по 16S рРНК).

**Методы исследований:** нативный раствор получали центрифугированием культуральной жидкости при 10000 об/мин в течение 30 минут [4]. Осаждение активного ила проводили в цилиндре объемом 100 мл и диаметром 60 мм, высота столба жидкости 135 мм, по методике предложенной [5]. Седиментационные свойства ила исследовались при дозе 2,9 г/л.

В работе использовались следующие образцы:

1. Контроль (100 мл) – активный ил коммунально-бытовых очистных сооружений г. Зеленодольск;
2. Контроль (98 мл) + нативный раствор р. *Bacillus* (2 мл);
3. Контроль (98 мл) + нативный раствор *Bacillus subtilis* (2 мл);
4. Контроль (98 мл) + суспензия р. *Bacillus* (2 мл);
5. Контроль (98 мл) + суспензия *Bacillus subtilis* (2 мл).

Согласно предварительным исследованиям был выбран объем вносимого нативного раствора и суспензии (2 мл) в активный ил.

## Результаты и обсуждения

Наибольшая эффективность седиментации активного ила при добавлении нативного раствора, была зарегистрирована для р. *Bacillus* – от 17% до 43%, по сравнению с контролем, в различных интервалах 30-минутного времени оседания (рис. 1). При этом не было отмечено повышения эффективности процесса седиментации в первые 5 минут осаждения активного ила с нативными растворами изолятов. Добавление в активный ил нативного раствора культуры *Bacillus subtilis* показало ускорение седиментации активного ила не более чем на 20% в начальный момент времени осаждения.

В случае внесения в активный ил клеточной суспензии р. *Bacillus* было показано значительное улучшение седиментации в первый момент времени: на 100%, 33%, 33%, 25%, 25%, 25%, 16%, 28% в период с 10 секунд по 3 минуту, соответственно, по сравнению с контролем. Добавление в активный ил суспензии *Bacillus subtilis* показало увеличение скорости осаждения активного ила на 100% на 10 секунде, 33% на 30 секунде и по 25% на 50 секунде и 1 минуте, соответственно.

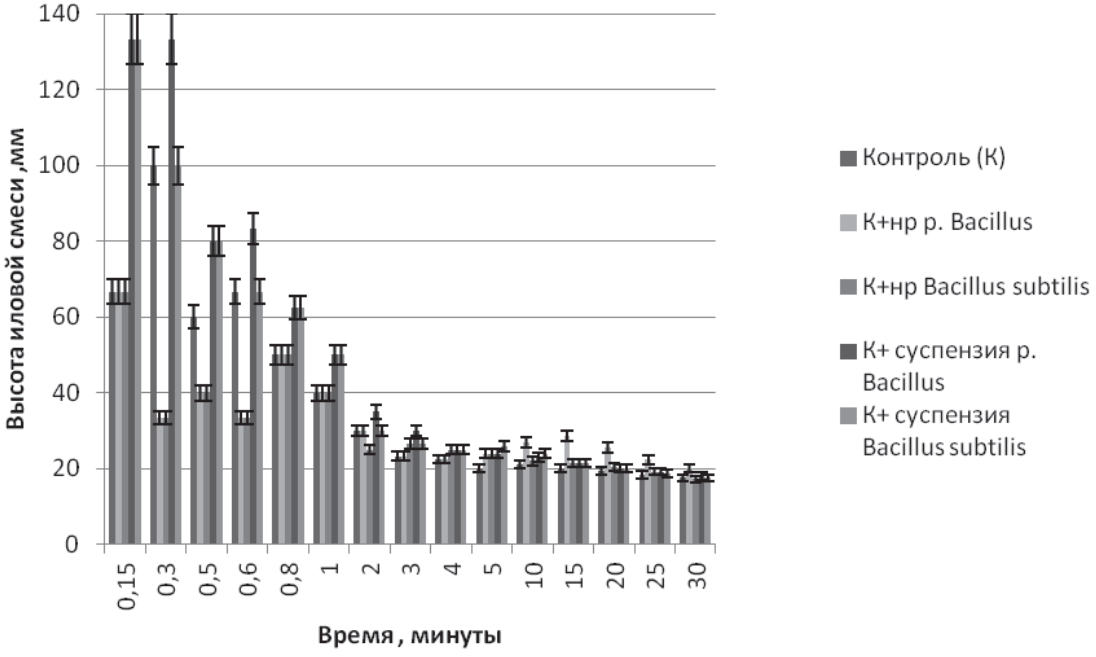



**Рис. 1.** Кривые кинетики снижения границы «ил–вода»

## Заключение

Обсуждение полученных выше данных позволяет предположить, что при внесении суспензии клеток в начальный период осаждения происходит быстрая агглютинация между поверхностными лектинами клеток продуцента и комплементарными компонентами активного ила и приводит к повышению эффективности осаждения активного ила. Внесение нативного раствора как источника внеклеточных лектинов обеспечивает ускорение процесса седиментации активного ила лишь по истечении первых 5 минут.

## Литература


1. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* / J.A. Ancy, M. Vasanthy, C. Thamarai, [et al] // Journal of Water Process Engineering. – 2020. – Vol. 39. – № 101742.
2. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* (Обзор) / В.С. Подгорский, Э.А. Коваленко, И.С. Карпова, [и др.]. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – No 3. – С. 256–263.
3. *Muhammadiev R.S.* Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* / R.S Muhammadiev, T.V Bagaeva // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Vol. 6(6). – P. 1756–1763.
4. *Луцик А.Д.* Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик – Львов: Вища шк., 1989. – 142 с.
5. Исследование седиментационных свойств иловой смеси городских канализационных очистных / А.А. Кулаков, Н.А. Макиша, А.Ф. Шафигуллина, Р. Хардер // Вестник МГСУ. – 2018. –Т. 13. – № 5 (116). – С. 643–650.

# Использование иммобилизованных в Са-альгинатные шарики клеток *Azospirillum brasilense* в реакциях деколоризации малахитового зеленого

*А.В. Коврижников[1], Авдеева Е.С.[2], М.А. Купряшина[1,2]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, alexander.kovrizhnikov@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38023

Красители трифенилметанового ряда за счет своей низкой себестоимости в настоящее время активно используются в текстильной, целлюлозно-бумажной, полиграфической, и даже фармацевтической промышленности, несмотря на их токсичность. Огромное количество красителей с производств попадают в сточные воды в неизменном состоянии, вследствие чего идет активное загрязнение акваторий данными органополлютантами. Одним из часто используемых красителей трифенилметанового ряда является малахитовый зеленый, хотя в ряде стран он запрещен из-за канцерогенных и мутагенных свойств [1]. Это достаточно устойчивое соединение, даже его восстановленная форма – лейкомалахитовый зеленый – обнаруживается в сыворотке крови, печени, почках и мышцах гидробионтов [2]. Зачастую физико-химические методы очистки не позволяют полностью удалить краситель из среды, более экологичной и экономически выгодной альтернативой выглядит использование микроорганизмов, способных разрушать синтетические красители, благодаря наличию окислительных ферментативных систем. Такими организмами могут послужить бактерии рода *Azospirillum,* имеющие доказанную эффективность в деструкции синтетических красителей [3]. Однако из-за токсического влияния, свободные бактерии, оказались не способны эффективно деколоризировать высокие концентрации красителей. Приемы иммобилизации могут решить эту проблему: повысить устойчивость бактерий и способствовать интенсификации их физиологических процессов. Иммобилизация клеток способна обеспечить биотехнологический процесс с возможностью повторного использования, что существенно проще по сравнению с подобными технологиями на основе суспензионных клеток.

Целью настоящей работы явилось исследование возможности использования иммобилизованных в Са-альгинатный гель клеток азоспирилл в реакциях деколоризации малахитового зеленого.

В качестве объекта исследования был выбран штамм *A. brasilense* SR80, из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. В работе использовался метод «мягкой» иммобилизации, основанный на включении микробных клеток в альгинатный гидрогель. Иммобилизацию осуществляли по следующей схеме: 2-суточную бактериальную культуру осаждали центрифугированием в асептических условиях и суспензировали в 5 мл фосфатно-солевого буфера, добавляли в 50 мл стерильного раствора 1, 2.5, 5% альгината натрия, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Формирование Са-альгинатных шариков проводили с использованием стерильного шприца, полимеризацию начинали 0.2 М $CaCl_2$. Полученные шарики дважды отмывали в чистом растворе 0.2 М $CaCl_2$, и хранили при 4 °С. Наличие жизнеспособных иммобилизованных клеток азоспирилл подтверждали высевом полученных образцов на плотную малатно-солевую среду, а также определяли дыхательную активность резазурин-тестом [4]. Эффективность деколоризации 0.01 мМ, 0.1 мМ, 0.5 мМ малахитового зеленого иммобилизованным клетками оценивали при инкубации в малатно-солевой среде, фосфатно-солевом буфере, картофельном отваре и водопроводной воде. Степень обесцвечивания анализировали спектрофотометрически и выражали в процентах. В условиях эксперимента оценивали время инкубации и возможность повторного использования клеток, иммобилизованных в Са-альгинатные шарики. Для исследования процесса интенсификации ферментативной активности бактерий отбирались пробы для определения пероксидазной активности по скорости окисления 2,6-диметоксифенола. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 μМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. О содержании белка судили по количественной реакции с реактивом Бредфорд. Контрольные колбы содержали интактные Са-альгинатные шарики.

Результаты исследования показали эффективность деколоризации высоких концентраций малахитового зеленого иммобилизованными клетками азоспирилл, по сравнению с суспензионными. Однако

данный процесс шел дольше по времени. Более низкая скорость обесцвечивания для иммобилизованных клеток вероятнее всего обусловлена ограниченностью среды, возникающей из-за плотного включения бактерий в структуру гидрогеля [4]. При проведении эксперимента степень деколоризации красителя увеличивалась почти линейно до полного обесцвечивания. В первые сутки нами отмечалось резкое падение концентрации красителя от 5 до 15% по сравнению с контролем, связанное исключительно с адсорбционной способностью самого альгината. Дальнейшие изменения в интенсивности обесцвечивания, положительно коррелирующие с увеличением ферментативной активности, отмечались, начиная с 4-х суток инкубации. Самые высокие значения степени деколоризации были получены при использовании в качестве матрицы 5% альгината при инкубации в малатно-солевой среде. В водопроводной воде эффективность обесцвечивания иммобилизованными клетками была на уровне 60%. В фосфатно-солевом буфере детектировалось разрушение Са-альгинатных шариков и высвобождение клеток.

Проведение повторных циклов обесцвечивания (10 дней инкубации с последующей отмывкой Са-альгинатных шариков в фосфатно-солевом буфере) показало возможность повторного использования иммобилизованных клеток для биодеколоризации малахитового зеленого лишь в течение 4 циклов. Далее, несмотря на высокие показатели степени биодеколоризации, происходило разрушение матрицы. Иммобилизованные клетки непрерывно обесцвечивали малахитовый зеленый после повторных циклов без значительной потери активности (снижение на 13%, 19%, 31% их первоначальной активности, соответственно).

Установлено, что иммобилизованные в Са-альгинатный гидрогель клетки *A. brasilense* SR80 не теряют жизнеспособность и сохраняют степень деколоризации не ниже 50% после 6 месяцев хранения при 4 °С в стерильном растворе хлорида кальция.

Достаточно перспективны биореакторы на основе экологически чистых сорбентов и непатогенных микроорганизмов, способных к окислению токсичных поллютантов, сочетающие достоинства сорбционного и биодеструктивного методов очистки, что приводит к высокой эффективности их использования.

## Литература


1. *Thetford D.,* Updated by Staff. Triphenylmethane and related dyes //Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. – 2000. – С. 1–19.
2. *Srivastava S., Sinha R., Roy D*. Toxicological effects of malachite green //Aquatic toxicology. – 2004. – Т. 66. – №. 3. – С. 319–329.
3. *Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е.* Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – №. 4. – С. 453–461.
4. *Ковриженков А.В. и др.* Получение жизнеспособных клеток azospirillum brasilense sr80, инкапсулированных в альгинатный гидрогель //Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2021. – Т. 21. – №. 3. – С. 298–303.


# 17β-Гидроксистероид дегидрогеназная и 7-гидроксилазная активность грибного штамма *Drechslera* sp.: специфичность, индуцибельность, транскриптомный анализ


*Коллеров В.В., Шутов А.А., Тарлачков С.В., Донова М.В.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), svkollerov@rambler.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38024


Регио- и стереоспецифическое гидроксилирование является наиболее востребованной реакцией функционализации стероидного ядра при получении ключевых интермедиатов ценных лекарственных форм (1). Использование для этой цели биокаталитического потенциала мицелиальных грибов, служащих ис-

точником различных уникальных монооксигеназ позволяет осуществлять устойчивый синтез ценных гидроксистероидов. К настоящему времени для микромицетов, представляющих различные таксономические группы, показана способность катализировать реакции гидроксилирования почти каждого атома углерода в стероидной структуре, при этом наибольший интерес представляют реакции селективного 14α, 11α/β- и 7α/β-гидроксилирования с образованием коммерчески ценных стероидных соединений (2, 3). Основным проблемами гидроксилирования стероидных субстратов мицелиальными грибами зачастую является невысокая степень целевой активности, а также наличие побочных реакций. Решение данных проблем основано на изучении свойств специфических ферментов структурной модификации стероидных соединений в клетках активных грибных штаммов, идентификации кодирующих их генов и получении рекомбинантных продуцентов.

Ранее, на этапе предварительного широкого скрининга мицелиальных грибов, представляющих отделы *Ascomycota* и *Zygomycota* (свыше сорока штаммов) в отношении 3-оксостероидов андростанового ряда был выявлен штамм *Drechslera* sp. активно катализирующий реакцию 7β-гидроксилирования андростадиендиона (АДД) с образованием свыше 40% (мол/мол) ценного стероидного метаболита 7β-ОН-АДД. Для данного штамма была также установлена способность катализировать реакцию 7α-гидроксилирования и восстановление 17-кето группы.

Целью настоящего исследования являлось изучение функциональности 17β-гидроксистероиддегидрогеназной (17β-ГСД) и 7-гидроксилазной ферментативных систем *Drechslera* sp., высокопроизводительное РНК секвенирование и транскриптомный анализ с выявлением дифференциально экспрессирующихся генов цитохром-Р450-монооксигеназ.

В ходе работы была изучена модификация стероидов андростанового ряда: андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД), андрост-4-ен-17β-ол-3-она (тестостерон, ТС) и андрост-5-ен-3β,17β-диола (дегидроэпиандростерона, ДГЭА) отмытым мицелием *Drechslera* sp. В качестве потенциальных индукторов стероид трансформирующей активности грибных клеток оценивали стероиды андростанового (андростендион (АД), АДД, ДГЭА), прегнанового (прогестерон, прегненолон) и холанового ряда (литохолевая кислота (ЛХК), а также β-ситостерин. Ингибиторный анализ проводили с использованием циклогексимида (ЦГ) и хлорамфеникола (ХФЛ). Структура стероидных метаболитов была подтверждена с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ, масс-спектрометрии (МС), $^{1}$Н и $^{13}$С ЯМР спектроскопии.

Конститутивный характер 17β-ГСД и индуцибельность 7-гидроксилазной активности в клетках мицелия *Drechslera* sp. подтверждены с использованием ингибиторного анализа: в присутствии ЦГ отмытый мицелий эффективно катализировал восстановление 17-карбонильной группы АДД и ДГЭА (но не 7-гидроксилирование) с образованием 17β-восстановленных производных: 1-дегидротестостерона (дгТС) и андростендиола, соответственно, в качестве единственных метаболитов с выходом более 95% (мол./мол.).

Для подтверждения индуцибельного характера 7-гидроксилазной активности *Drechslera* sp. и определения наиболее эффективного индуктора проведена оценка индуцирующего действия различных стероидов при трансформации АДД отмытым мицелием. За исключением β-ситостерина, все протестированные стероиды индуцировали активность 7-гидроксилазы. Максимальный индуцирующий эффект был обнаружен для ДГЭА и уменьшался в следующем порядке: ДГЭА>прогестерон>АД>ТС>АДД>прегненолон>ЛХК.

Аналогичный спектр продуктов наблюдали при трансформации АДД в присутствии ХФЛ контрольным, – не индуцированным, и индуцированным ДГЭА мицелием, что доказывает отсутствие влияния ХФЛ на синтез 7-гидроксилазы в клетках мицелия *Drechslera* sp. и указывает на ее немитохондриальную локализацию.

Для выявления кандидатных генов цитохром-Р450-монооксигеназ, кодирующих 7-гидроксилазу были выделены образцы тотальной РНК из контрольного неиндуцированного и индуцированного в течение 6 ч ДГЭА мицелия. Высокопроизводительное секвенирование мРНК, выделенных из соответствующих образцов тотальной РНК, последующая сборка транскриптомов *de novo* и их аннотация выявили более 10 тысяч транскриптов с открытой рамкой считывания. Выявлено пятнадцать генов, экспрессия которых максимально увеличивалась в присутствии ДГЭА, при этом три установленных аминокислотных последовательности выявленных дифференциально экспрессирующихся генов имели консервативный участок, характерный для ферментов семейства цитохром Р450. Уровень экспрессии одного из генов цитохром Р450 увеличивался больше всего (в 322 раза (Fold change)) в ответ на индукцию грибных кле-

ток стероидным субстратом ДГЭА, что позволяет рассматривать его, как наиболее вероятного кандидата, кодирующего синтез стероидной 7-гидроксилазы.

Дальнейшие исследования будут направлены на клонирование и гетерологическую экспрессию данного гена в клетках рекомбинантных штаммов бактерий или дрожжей с подтверждением функциональной активности кодируемого им фермента.

Результаты важны для идентификации гена новой грибной стероидной 7-гидроксилазы и открывают перспективы разработки способов селективного получения целевых 7-гидроксилированных и 17-восстановленных стероидов на основе ферментных систем грибных биокатализаторов.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 21-64-0024).*

## Литература

1. *Pellissier H., Santelli M.* 2001. Chemical and biochemical hydroxylations of steroids, a review. Organic Preparations and Procedures Inc. 33:1–58.
2. *Kristan K., Rižner T.L.* 2012. Steroid-transforming enzymes in fungi. J Steroid Biochem Mol Biol. 129:79-91.
3. *Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M.A.* 2015. Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatal Biotransformation. 33:1–28.

# Влияние рутина на деградацию полициклического ароматического углеводорода ризосферным штаммом Mycolicibacterium gilvum

*Кузянов Д.А.[1], Плешакова Е.В.[1], Панченко Л.В.[2], Муратова А.Ю.[2]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
[2] ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов
dimakuzyanov2000@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38025

На сегодняшний день полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) признаны приоритетными загрязняющими веществами окружающей среды. Эти загрязнители попадают в окружающую среду в результате естественных процессов, а также антропогенной деятельности. Вредные свойства ПАУ, такие как высокая токсичность, мутагенность и канцерогенность, а также их устойчивость к биологическому разложению и способность к биоаккумуляции сделали ремедиацию загрязненных ими сред крайне важной задачей.

В настоящее время доступны различные физические и химические методы очистки от ПАУ, такие как сжигание, ультразвуковая обработка, экстракция растворителем и т.д. Но у этих технологий есть несколько недостатков, таких как нормативная нагрузка, стоимость, сложность, а иногда и неэффективность полного удаления соединений. Такие последствия можно устранить, применяя экологически безопасные методы биологической очистки, к которым относятся технологии био- и фиторемедиации, использующие для восстановления природных объектов жизнедеятельность микроорганизмов и растений.

К настоящему времени выделено и описано немало микроорганизмов-деструкторов ПАУ, однако многочисленные факторы, влияющие на биодеградацию этих соединений, изучены не достаточно и продолжают активно исследоваться. В частности, рядом исследователей показано селективное действие некоторых растений на формирование ризосферного почвенного микробного сообщества, разрушающего ПАУ-загрязнители эффективнее, чем в корневой зоне других растений [1]. Предположительно специфический состав корневых выделений этих растений может иметь решающее значение для формирования активного сообщества ПАУ-деструкторов. Например, такие вторичные метаболиты растений как фенольные соединения и флавоноиды являются важными и специфическими компонентами корневых экссудатов. Структурное подобие этих соединений некоторым поллютантам (в том числе ПАУ) может предполагать их влияние на интенсивность ризодеградации загрязнителей. Понимание взаимосвязей

между биохимией вторичных метаболитов растений, симбиотическим сообществом микробов и судьбой органических загрязнителей имеет важное значение для успешного применения фиторемедиации.

Настоящая работа посвящена изучению влияния растительного флавоноида рутина на эффективность биодеградации ПАУ ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum* PAM1.

Штамм *M. gilvum* PAM 1 был выделен в лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН, как деструктор ПАУ из ризосферы люцерны (*Medicago sativa* L.), выращенной в нефтезагрязненной почве [2]. Деструктивную активность микроорганизма по отношению к ПАУ изучали, культивируя его в жидкой минеральной среде [3], содержащей фенантрен в концентрации 0,2 г/л. Влияние рутина на деградацию ПАУ оценивали, добавляя флавоноид в среду в концентрациях 0,05, 0,1 и 0,2 мМ. Культивирование проводили при 30 °С в условиях аэрации на качалке (130 об./мин.) в течение 14 сут. Остаточное содержание фенантрена и рутина в среде после культивирования микроорганизма анализировали методом ВЭЖХ. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel пакета MS Office 2019.

В ходе исследования было установлено, что интенсивность деградации фенантрена штаммом *M. gilvum* PAM1 зависела от используемой концентрации рутина в среде. Так, в концентрации 0,2 мМ рутин, стимулируя рост микроорганизма, угнетал деградацию ПАУ. В минимальной используемой концентрации (0,05 мМ), наиболее приближенной к реальному содержанию флавоноидов в корневых выделениях, рутин проявлял тенденцию к стимуляции деструкции фенантрена (см. рисунок).

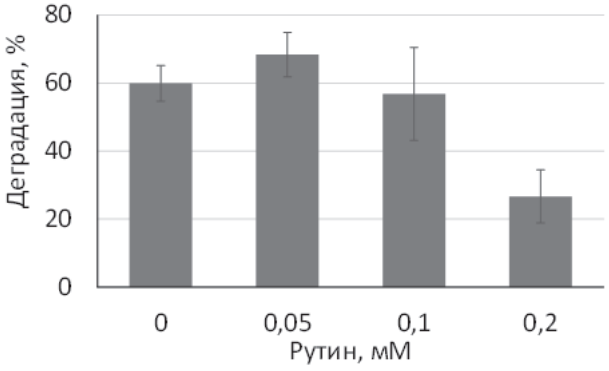



**Рис.** Влияние рутина на деградацию фенантрена (0,2 г/л) штаммом M. gilvum PAM1

Полученные данные позволяют предположить стимулирующее действие флавоноидов корневых выделений растений на микробную деградацию ПАУ в ризосфере растений. Однако для окончательного утверждения необходимы дополнительные с использованием других представителей этих соединений.

Дополнительным интересным результатом проведенного эксперимента являлось наблюдаемое увеличение концентрации рутина (на 85,7%) в среде после культивирования микроорганизма. При этом, присутствие фенантрена оказывало стимулирующее действие на синтез флавоноида. Обнаружены немногочисленные сообщения о синтезе флавоноидов представителями *Saccharomyces*, а также некоторыми актинобактериями [4]. Для бактерий рода *Mycolicibacterium* эта способность отмечена нами впервые.

Таким образом, проведенное исследование по влиянию рутина на деградацию трехкольцевого ПАУ ризосферным штаммом-деструктором позволило выявить стимулирующий эффект растительного флавоноида на биотрансформацию/биодеградацию фенантрена, а также констатировать дополнительный биосинтез рутина штаммом *M. gilvum* PAM1 и стимулирующий эффект ПАУ на этот процесс.

## Литература


1. *Bourceret A., Leyval C., Faure P., Lorgeoux C., Cebron A.* 2018. High PAH degradation and activity of degrading bacteria during alfalfa growth where a contrasted active community developed in comparison to unplanted soil. Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (29), 29556–29571.
2. *Golubev S.N., Muratova A.Yu., Panchenko L.V., Shchyogolev S.Yu., Turkovskaya O.V.* 2021. *Mycolicibacterium* sp. strain PAM1, an alfalfa rhizosphere dweller, catabolizes PAHs and promotes partner-plant growth. Microbiol. Res. 253, 126885.
3. *Muratova A., Hübner Th., Tisher S., Turkovskaya O., Möder M., Kuschk P.* 2003. Plant – rhizo-sphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. Int. J. Phytorem. 5(2), 137–151.
4. *Madhavan A., Raveendran S., Arun KB, Pandey A., Parameswaran B., Gnansounou E.* 2019. Microbial production of flavonoids: engineering strategies for improved production / In: Saran S., Babu V., Chuabey A. (eds.): High Value Fermentation Products (Human Health). Scrivener Publishing LLC. Vol. 1, 365–380.

# Конверсия холестерина термофильными актинобактериями

*Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Донова М.В.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), lobastova_t@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38026

Стероиды представляют собой многочисленный класс органических молекул, широко распространенных в природе. К настоящему времени обнаружено свыше 1000 стероидов естественного происхождения (Chiang et al., 2020). В окружающую среду нативные стероиды поступают в колоссальных объемах в составе отмирающих остатков растений, грибов, водорослей, а также экскрементов теплокровных, включая человека. Разложение стероидных соединений эффективно осуществляется актинобактериями, широко представленными в различных экологических нишах.

Процессы катаболизма стеринов наиболее изучены для мезофильных актинобактерий ряда патогенных видов родов *Mycobacterium*, *Rhodococcus* и *Nocardia*, а также непатогенных штаммов *Mycolicibacterium* (Donova, 2007; Olivera and Luengo, 2019). Сведения, касающиеся конверсии стероидных соединений термофильными бактериями, весьма ограничены и представлены несколькими публикациями. Так, сообщалось, что термофильные бактерии *Bacillus thermoglucosidasius* и *Geobacillus kaustophilus* гидроксилировали прогестерон (Sideso et al., 1998; Al-Tamimi et al., 2010). Восстановление 3-кетогруппы и $\Delta^4$-двойной связи в различных стероидных кетонах андростанового и прегнанового рядов осуществляла экстремально термофильная бактерия *Calderiella acidophila* (Sodano et al., 1982).

Ранее нами была обнаружена способность термофильной актинобактерии *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ac-666, выделенной из багассы сахарного тростника (Lacey and Goodfellow 1975), к трансформации стероидных соединений, – литохолевой кислоты (Kollerov et al., 2013), дегидроэпиандростерона, андростендиона, 3β,7(α/β)-дигидрокси-5-ен-D-гомо-лактонов (Lobastova et al., 2019).

В данной работе изучали биоконверсию холестерина этим штаммом и другими термофильными актинобактериями рода *Saccharopolyspora*: *S. rectivirgula* ВКМ Ac-642, *S. rectivirgula* ВКМ Ac-810, *Saccharopolyspora* sp. ВКМ Ac-2789, *Saccharopolyspora* sp. ВКМ Ac-2790, а также *Thermomonospora curvata* ВКМ Ac-1241.

Конверсию холестерина штаммами рода *Saccharopolyspora* проводили, как описано ранее (Shtratnikova et al., 2020) при температуре 45 °С. Для *Th. curvata* ВКМ Ac-1241 использовали глюкозо-пептонную среду. Субстрат в концентрации 0.5 г/л вносили в виде горячего этанольного раствора. Концентрация этанола в среде составляла 1% (об./об.). Анализ холестерина и продуктов его трансформации проводили методом ТСХ согласно ранее описанной методике (Shtratnikova et al., 2020).

Среди исследуемых термофильных штаммов наиболее эффективно трансформировал холестерин штамм *S. hirsuta* ВКМ Ac-666 (табл. 1). Основным определяемым продуктом конверсии субстрата с 3-кето-4-ен структурой был холестенон (2–4%, вес.).

*Таблица 1*

**Содержание остаточного холестерина при его конверсии термофильными актинобактериями**

| Штамм | Содержание холестерина после 144 ч биоконверсии, % (вес.) |
|---|---|
| *S. hirsuta* ВКМ Ac-666 | 11–15 |
| *S. rectivirgula* ВКМ Ac-642 | 93–95 |
| *S. rectivirgula* ВКМ Ac-810 | 100 |
| *Saccharopolyspora* sp. ВКМ Ac-2789 | 68–71 |
| *Saccharopolyspora* sp. ВКМ Ac-2790 | 70–73 |
| *Thermomonospora curvata* ВКМ Ac-1241 | 90–92 |

Низкое содержание остаточного холестерина при его конверсии термофильным штаммом *S. hirsuta* ВКМ Ac-666 согласуется с результатами наших исследований по секвенированию полного генома данного штамма (Lobastova et al., 2020). В геномной последовательности штамма ВКМ Ac-666 выявлены кандидатные гены, кодирующие ферменты катаболизма холестерина.

В настоящей работе среди шести тестируемых термофильных штаммов только одна культура: *S. rectivirgula* ВКМ Ac-810 была не способна окислять холестерин. Другие пять штаммов термофильных актинобактерий трансформировали субстрат в разной степени, составлявшей от 5 до 89% (табл. 1).

Таким образом, в отличие от представителей термофильных бактерий других родов, для которых показана способность к осуществлению отдельных реакций структурной модификации стероидов, актинобактерии рода *Saccharopolyspora* (за редким исключением) утилизируют холестерин, что свидетельствует о наличии у них полиферментного пути катаболизма стеринов.

*Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-00024).*

## Литература

1. *Chiang Y.-Ru., Wei S. T.-S., Wang Po-H., Wu P.-H., Yu C.-P.* 2020. Microbial Biotechnology. 13(4), 926–949. DOI:10.1111/1751-7915.13504
2. *Donova M.V.* 2007. Appl. Biochem. Microbiol., 43:1-14. DOI:10.1134/S0003683807010012
3. *Olivera E.R., Luengo J.M.* 2019. Genes, 10:512. DOI:10.3390/genes10070512
4. *Sideso O., Williams R.A., Welch S.G., Smith K.E.* 1998. Steroid Biochem. Mol. Biol., 67:163–169. DOI: 10.1016/s0960-0760(98)00101-0
5. *Al-Tamimi S., Al-Awadi S., Oommen S., Afzal M.* 2010. Int. J. Food Sci. Nutr., 61(1):78–86. DOI: 10.3109/09637480903292619
6. *Sodano G., Trabucco A., De Rosa M., Gambacorta A.* 1982. Experientia, 38:1311-1312. DOI:10.1007/BF01954920
7. *Lacey J., Goodfellow M.J.* 1975. J. Gen. Microbiol., 88:75-85. DOI:10.1099/00221287-88-1-75
8. *Kollerov V.V., Monti D., Deshcherevskaya N.O. et al.* 2013. Steroids, 78:370–378. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.12.010
9. *Lobastova T.G., Khomutov S.M., Shutov A.A., Donova M.V.* 2019. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103(12):4967–4976. DOI: 10.1007/s00253-019-09828-6
10. *Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Bragin E.Y., Lobastova T.G., Shutov A.A., Kazantsev A.V., Donova M.V.* 2020. Genes, 11:1229. DOI:10.3390/genes11101229
11. *Lobastova T.G., Fokina V.V., Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V.* 2020 Microbiol. Resour. Announc., 9:e01327-19. DOI:10.1128/MRA.01327-19.

# Перспективные биокатализаторы конверсии олеананових пентациклических тритерпеноидов

*Лучникова Н.А.[1,2], Гришко В.В.[3], Ившина И.Б.[1,2]*

[1] Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
(Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН), г. Пермь
[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, luchnikova.n@mail.ru
[3] Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт технической химии УрО РАН), г. Пермь

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38027

Доля лекарственных препаратов, полученных на основе вторичных метаболитов растений, составляет около 25% мирового фармацевтического рынка [1]. Интерес исследователей в области медицины и фармакологии к нативным пентациклическим тритерпеноидам, в частности, представителям ряда олеанана, часто обусловлен их доступностью, а также широким спектром проявляемой данными соединениями биологической активности, включая противомикробную, противовоспалительную, противоопухолевую, цитотоксическую, гепатопротекторную, антидиабетическую и др. Вместе с тем молекулы тритерпеноидов характеризуются повышенной гидрофобностью, что значительно ограничивает их применение в

качестве эффективных фармакологических агентов. В настоящее время одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности и биодоступности тритерпеноидов является химическая модификация, обычно протекающая при повышенных значениях температуры и pH, часто с использованием дорогостоящих реагентов и необходимостью введения защитных групп реакционно-активных центров молекулы [2]. Альтернативный подход к получению ценных производных – это реакции биотрансформация терпеноидов на основе каталитической активности микроорганизмов, реализуемые при нормальных и экологически безопасных условиях среды, с высоким уровнем регио- и стереоселективности, в одну технологическую стадию. Кроме того, микробная конверсия позволяет осуществлять специфическую модификацию сайтов молекулы тритерпеноида, которые не доступны или модификация которых протекает с низкой эффективностью в условиях синтетических превращений [3]. Среди известных биокатализаторов процессов биотрансформации олеананового тритерпеноидов наиболее изучены представители мицелиальных грибов, тогда как бактериальные катализаторы представлены лишь единичными видами грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Nocardia* и *Streptomyces* [4]. Однако отмеченные биокатализаторы имеют значительные недостатки. Так, грибы, как правило, характеризуются мицелиальным типом роста, образованием спор и микотоксинов, а описанные немногочисленные бактериальные катализаторы нередко представлены видами, отдельные штаммы которых являются патогенами. В связи с этим необходимы дальнейшие углубленные исследования процессов биотрансформации олеананового пентациклических тритерпеноидов и поиск новых безопасных бактериальных штаммов, использование которых позволит реализовать высокоэффективный синтез тритерпеновых производных с выраженной биологической активностью.

Одной из активно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные бактерии рода *Rhodococcus* [5]. Типично бактериальный характер роста, синтез биосурфактантов, способность расти на минимальных средах, высокая катаболическая активность и уникальные ферментативные возможности обусловливают перспективность использования родококков в качестве эффективных биокатализаторов процесса направленной конверсии олеананового тритерпеноидов.

С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, www.iegmcol.ru, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, реестровый номер Уникальной научной установки 73559) показана способность *Rhodococcus* spp. к трансформации олеананового тритерпеноидов на примере олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот. Так, отдельные штаммы *R. rhodochrous* катализировали образование окисленных производных ОК *m/z* 468,3 и ГК *m/z* 482,4 ([M]+, данные ГХ-МС для метилированных продуктов биотрансформации), масс-спектры которых совпадают с масс-спектрами метиловых эфиров 3-оксо-олеан-12-ен-28 -овой кислоты и 3,11-диоксо-олеан-12-ен-29-овой кислоты соответственно, обладающих выраженной биологической активностью [6–8]. С использованием метода высокоточной респирометрии проведены сравнительные исследования метаболической активности ключевых биокатализаторов. С применением системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования зарегистрировано образование обособленных клеточных агрегатов на поверхности кристаллических частиц тритерпеноидов, с использованием отдельных клеточных фракций экспериментально подтверждено участие в процессе биотрансформации ОК и ГК мембраносвязанных ферментных комплексов. Биоинформатический анализ последовательностей генома штаммов *R. rhodochrous* в системе NCBI позволил определить функциональные гены, участвующие в процессах бактериальной трансформации олеананового тритерпеноидов. Полученные данные расширяют представление о биотехнологическом потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и их возможном использовании в качестве биокатализаторов процесса конверсии сложных гидрофобных субстратов с целью получения биоактивных соединений.

*Работа поддержана грантом РФФИ (20-34-90104) и выполнена в рамках госзаданий Минобрнауки РФ (АААА-А19-119031890083-9 и АААА-А19-119112290008-4) с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.*

## Литература

1. *Calixto J.B.* The role of natural products in modern drug discovery. An. Acad. Bras. Cienc. 2019. Vol. 91. P. 1–7.
2. *Alho D.P.S. et al.* Synthesis and antiproliferative activity of novel heterocyclic glycyrrhetinic acid derivatives. Molecules. 2019. Vol. 24. P. 766.

3. *Shah S.A.A. et al.* Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. P. 12027–12060.
4. *Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B.* Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids. Molecules. 2020. Vol. 25. P. 5526.
5. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V.* Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // Microbial Resources: from Functional Existence in Nature to Application / ed. Kurtboke I. Elsevier, 2017. P. 121–148.
6. *Huang D. et al.* Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. Cancer Lett. 2006. Vol. 233. P. 289–296.
7. *Funari C.S.* Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (*Verbenaceae*) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity. Acta Amaz. 2016. Vol. 46. P. 411–416.
8. *Choudhary M.I., Siddiqui Z.A., Nawaz S.A.* Microbial transformation of 18β-glycyrrhetinic acid by *Cunninghamella elegans* and *Fusarium lini*, and lipoxygenase inhibitory activity of transformed products. Nat. Prod. Res. 2009. Vol. 23. P. 507–513.

# Влияние *Rhizobium leguminosarum* на рост и содержание пролина в трансгенных по гену psl и rapA1 растениях томата

*Масленникова Д.Р.[1,2], Емелина А.А.[1], Чубукова О.В.[1,2], Вершинина З.Р.[1,2]*

[1] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, г. Уфа
dishaoil@mail.ru
[2] ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет», г. Уфа

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38028

Восприимчивость растений к тем или иным бактериям – микросимбионтам и успешное взаимодействие с ними определяется синтезом сигнальных молекул, индуцируемых как бактериями, так и растениями. (Vershinina et al., 2021). Надо отметить, что в литературе крайне мало информации о том, как в процессе реализации ассоциативных симбиозов меняется метаболизм самого растения. Так, аминокислота пролин, играет значительную физиологическую роль в жизни растений, особенно в процессе репродукции, кроме того, его роль, как осмопротектанта и антиоксиданта, в формировании устойчивости растений к стрессовым факторам трудно переоценить (Радюкина и др., 2008; Moukhtari et al., 2020). Таким образом, функции пролина в растениях достаточно хорошо изучены, при этом в литературе мало работ, посвященных изучению содержания и роли пролина в растениях при реализации их симбиотических взаимодействий с бактериями. В связи с этим цель нашего исследования состояла в том, чтобы оценить содержание пролина в растениях томата (*Solanum lycopersicum L.)* промышленного сорта Грунтовый Грибовский 1180 дикого типа и в трансгенных по генам лектина гороха посевного *psl* и ризобиального адгезина *rapA1*, после предварительной инокуляции корней микросимбионтом бобовых растений *Rhizobium leguminosarum* VSy3, обладающей ростостимулирующей активностью (Вершинина и др., 2021). В работе использовали общепринятые методы микробиологического культивирования бактерий и определения их уровня адгезии на корнях растений, содержание пролина в целых проростках томата определяли согласно (Bates et al., 1973). Оценку сухой массы корней (n = 15), проводили путем высушивания их в сушильном шкафу до конечного веса.

В ходе работы было обнаружено, что инокуляция растений ризобиями в течение 2-х суток приводила к увеличению содержание, по сравнению с инокулированнами растениями дикого типа, у трансгенных по гену *rapA1*, – в 1,7 раза, и трансформированных геном *psl*, – в 2,2 раза соответственно, что положительно коррелировало с уровнем адгезии бактерий и с накоплением ими сухой биомассы, особенно в случае томатов, трансформированных геном *psl* (Таблица).

Факт отсутствия негативного влияния бактерий на растения подтверждался неизменным уровнем окисленной формы глутатиона (GSSG) и МДА во всех вариантах опыта (Vershinina et al., 2021). Полученные результаты позволяют предположить, что повышение уровня пролина при ассоциативных

*Таблица*

| Вариант | Сухая биомасса корней, г | Уровень адгезии, КОЕ/г*$10^6$ | Пролин, мкМ/г сырой массы растения |
|---|---|---|---|
| Дикий тип + *R. leguminosarum* VSy3 | 0.068 ± 0.0027 | 21. 6±4.32 | 0.9±0.036 |
| Трансгены psl + *R. leguminosarum* VSy3 | 0.089 ± 0.0036 | 193±38.7 | 1,98±0.079 |
| Трансгены *rapA1* + *R. leguminosarum* VSy3 | 0.074 ± 0.0029 | 69.1±13.82 | 1.53±0.061 |

взаимодействиях, вероятно, является одним из механизмов антиоксидантной системы растения, что позволяет стабилизировать их редокс – статус при колонизации бактериями поверхности корней. Данный факт демонстрирует перспективность изучения уровня пролина в растениях для оценки эффективности адсорбции бактерий при формировании искусственных симбиотических систем.

*Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А21-121011990120-7) с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».*

## Литература

1. *Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М, Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Баймиев Ан.Х. Баймиев Ал.Х.* Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. 2021. Т. 90. с. 191-203. doi: 10.31857/S0026365621020154
2. *Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В.* Участие пролина в системе антиокидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. Т.55. 2008. С. 721–730.
3. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205–207
4. *El Moukhtari A., Cabassa-Hourton C., Farissi M., Savouré A.* How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? // Front Plant Sci. 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.01127
5. *Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Maslennikova D.R.* Glutathione status in the roots of tomato plants transgenic by genes *psl* and *rapA1* in the presence of *Rhizobium leguminosarum*// Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. pp. 923–930. doi: 10.1134/S1021443721050228

# Галофильные бактерии, выделенные из солёных озёр Эльтон и Карун, как продуценты внеклеточных протеаз и амилаз

*Матевосян С.Г.[1,2], Сигида Е.Н.[2], Каневский М.В.[1,2], Федоненко Ю.П.[1,2], Коннова С.А.[1,2]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов
sona.matevosyan12@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38029

Галофильные бактерии относятся к экстремофилам, которым для активной жизнедеятельности необходимо наличие в среде высоких концентраций NaCl. Одним из механизмов адаптации бактерий к этому стрессовому фактору является продукция широкого спектра внеклеточных биополимеров, в том числе ферментов, нашедших применение в различных областях биотехнологии [1, 2]. Особенностью экзоферментов галофильных бактерий является полиэкстремофильность – способность функционировать при высоких концентрациях NaCl и в широком диапазоне значений температуры и pH, при которых другие ферменты денатурируют. В связи с этим, поиск штаммов–продуцентов внеклеточных ферментов среди галофильных бактерий и оптимизация условий культивирования по их продукции является востребованным направлением в микробиологии.

Целью работы являлся поиск продуцентов протеаз и амилаз и оптимизация условий их культивирования по продукции фермента среди 16 штаммов грамположительных и грамотрицательных галофильных бактерий, ранее изолированных из образцов соли озёр Карун (Египет) и Эльтон (Россия) и отличающихся по способности роста при различных концентрациях NaCl – пограничо экстремальные, умеренные и слабые галофилы [3].

Для выявления ферментативной активности использовали дифференциально-диагностические плотные среды со специфическими субстратами: для протеаз – молочный агар [4], для амилаз – растворимый крахмал [5]. Посев штаммов производили уколом, чашки Петри инкубировали при 30°С в течение 7 суток. Интенсивность синтеза внеклеточных ферментов оценивали по величине диаметра зоны просветления среды вокруг колоний бактерий на протяжении 7 суток; для выявления амилолитической активности агаровую пластинку обрабатывали раствором Люголя.

Для оптимизации условий культивирования по продукции внеклеточных протеаз отобранные штаммы культивировали в течение 7 суток при 20, 30 и 40 °С глубинным методом в жидкой питательной среде, содержащей сухое молоко и NaCl – 5, 10 и 15% [4]. Протеолитическую активность в культуральной жидкости определяли колориметрическим методом с реактивом Фолина-Чиокалтеу [6]. Определение белков осуществляли колориметрическим методом с помощью реактива Бредфорда [7].

В результате скрининга из 16-ти штаммов 7 штаммов демонстрировали протеолитическую и амилолитическую активность: *Halobacillus dabanensis* EG1HP4QL, *Bacillus licheniformis* EG1QL30, *Bacillus halotolerans* RU2EL4, *Bacillus velezensis* EG5QL12, *Halomonas* sp. EG27S8QL, *Halomonas* sp. EG24S8QL и *Halomonas* sp. EG30S8QL. Только протеолитическая активность была выявлена у штамма *Halomonas ventosae* RU5S2EL.

Наибольшую протеолитическую (диаметр зоны просветления 40–45 мм к 7-му дню культивирования) и амилолитическую (диаметр зоны просветления 30–35 мм к 7-ым суткам культивирования) активность проявили штаммы, представленные на рис. 1.

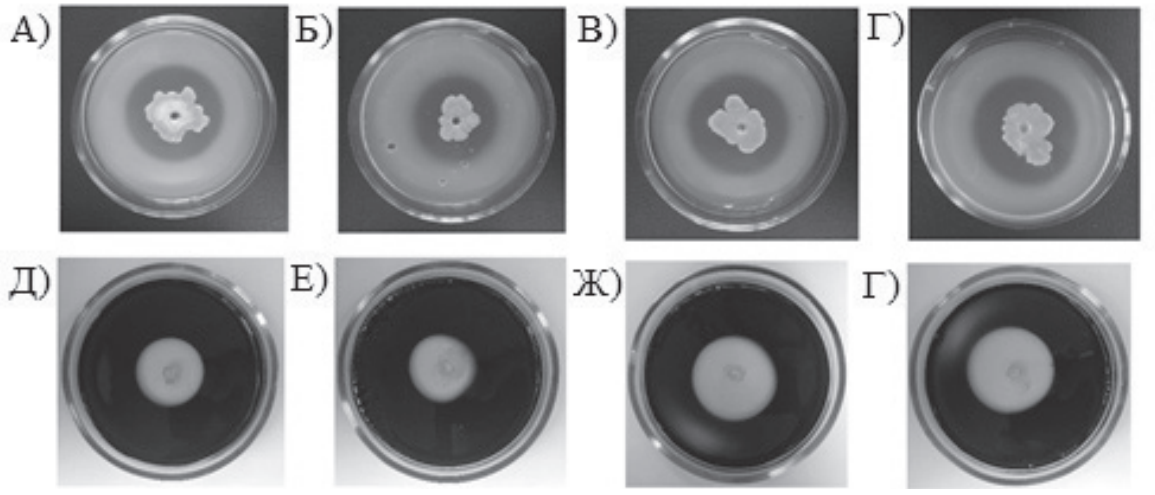



**Рис. 1.** Бактериальные штаммы, демонстрирующие протеолитическую (I) и амилолитическую (II) активность: А) EG1HP4QL; Б) RU2EL4; В) EG5QL12; Г) EG1QL30; Д) EG24S8QL; Е) EG27S8QL; Ж) EG30S8QL

Для всех исследуемых штаммов в заданном диапазоне температуры наибольшая продукция протеаз в культуральной жидкости (ед/мл среды и ед/мг белка) была выявлена при выращивании в среде, содержащей 5% NaCl. Максимум продукции экзопротеаз у исследуемых штаммов достигался к 3 суткам культивирования при температуре 30 °С, к 3-4 суткам при 40 °С и к 7 суткам культивирования при 20 °С. После достижения максимума активность фермента в культуральной среде исследуемых штаммов практически не изменялась к 7 суткам культивирования при 30 °С (кроме штамма RU2EL4) и существенно снижалась при 40 °С. Штаммы RU2EL4, EG5QL12 и EG1QL30 демонстрировали сходную активность продукции экзопротеаз при 20 °С в течение всего периода измерения и в течение 1-4 суток выращивания при 30 °С. Ферментативная активность штамма EG1HP4QL в течение всего периода

культивирования при 30 °С была существенно выше, чем у остальных исследуемых штаммов. Наибольшие показатели ферментативной активности были выявлены у штаммов RU2EL4 и EG5QL12 на 3 сутки культивирования при 40 °С.

Таким образом, отобранные штаммы галофильных бактерий являются перспективными объектами для выделения внеклеточных протеаз и амилаз, изучения их биохимических свойств, ферментативной активности и биотехнологического потенциала в различных сферах жизнедеятельности.

## Литература


1. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes / S. Kumar [et al.] // Brazil. J. Microbiology. – 2012. – V. 43, N 4. – P. 1595–1603.
2. *Яковлева А.К.* Перспективы использования галофильных и галотолерантных микроорганизмов в биотехнологии / А.К. Яковлева, З.А. Канарская, А.В. Канарский // Вестник технологического университета. – 2017. – Т. 20, № 8. – С. 147–151.
3. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из солёных озёр Карун (Египет) и Эльтон (Россия) / И.М. Ибрахим [и др.] // Известия Саратовского Университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 345–353.
4. *Elbanna K.* Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt / K. Elbanna, I. M. Ibrahim, A.-M. Revol-Junelles // Extremophiles. – 2015. – V. 19, N 4. – P. 763–774.
5. *Качан А.В.* Характеристика природного изолята *Bacillus* sp., продуцирующего термостабильную амилазу / А.В. Качан, О.Б. Русь, А.Н. Евтушенков // Вестник БГУ. – 2008. – Т. 2, № 3. – С. 47–50.
6. *Folin O.* On tyrosine and tryptophan determination in proteins. / O. Folin, V. Ciocalteu // Journal of Biological Chemistry. – 1929. – V. 73. – P. 627–649.
7. *Скоупс Р.* Методы очистки белков / Р. Скоупс // М.: Мир. – 1985. – С. 315–342.


# Видоспецифичность влияния сортов солода на конечную степень сбраживания при производстве пива


*Милованова А.А.*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский Государственный Университет», linka.milovanova.08@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38030


Известно, что при перемене сорта солода, в различных диапазонах, меняются показатели бродильного процесса для отдельной партии дрожжей. Сорта солода и качество его обработки также влияют на флокуляционную способность, скорость оседания дрожжей в конце основного брожения и на органолептические показатели готового пива. В настоящее время некоторые пивоваренные производства Краснодарского края используют солод, импортируемый из Германии, Финляндии и Чехии. Солод отечественного производства, в частности дагестанский, по тем или иным характеристикам оказывался неудовлетворительным. В ходе лабораторного исследования сравнили расы дрожжей верхового и низового брожения (*Saccharomyces cerevisiae и Saccharomyces carlsbergensis* соответственно), на разных сортах солода и их способность сбраживаться в определенном сусле. Данные, полученные в ходе экспериментов показаны на рис. 1.

В эксперименте использовали биомассу дрожжей второго брожения. При сравнительном анализе сбраживаемых *Saccharomyces carlsbergensis* субстратов было выявлено, что наиболее полно сбраживается сусло, приготовленное из чешского солода, затем, по убыванию степени сбраживания, идут сорта немецкий и финский. Это говорит о том, что чешский солод является наиболее оптимальным при использовании рас верхового и низового брожения, а наименее оптимальным является финский солод.

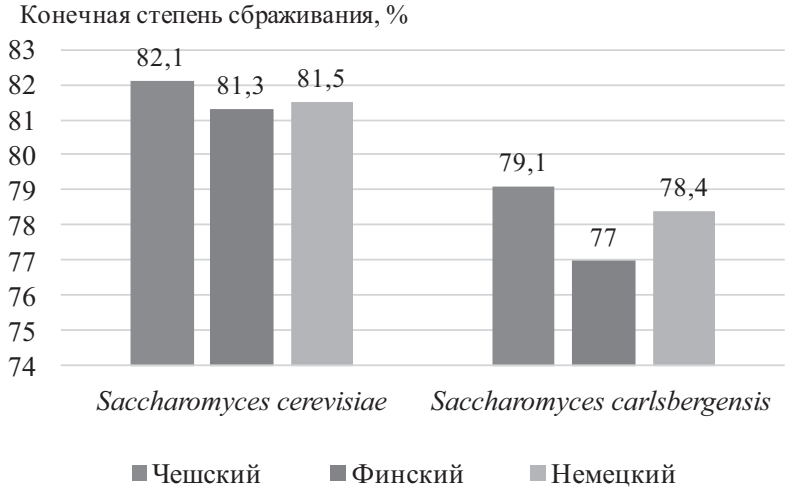



**Рис. 1.** Зависимость конечной степени сбраживания от сорта солода

Для дрожжей верхового брожения, возбуждаемого дрожжами вида *Saccharomyces cerevisiae*, было обнаружено, что высокий показатель степени сбраживания характерен для всех сортов солода и по этим показателям существенно превосходит дрожжи низового брожения вида *Saccharomyces carlsbergensis*, что характеризует меньшую зависимость верхового брожения от типа солода.

## Влияние биогенных аминов на рост культуры *Scenedesmus quadricauda*

*Олескин А.В., Постнов А.Л., Цао Боян*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Биологический факультет, кафедра общей экологии и гидробиологии, oleskiny@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38031

Зеленые микроводоросли являются частью фитопланктона пресноводных экосистем. Они играют немаловажную роль в трофических сетях этих экосистем; например, служа пищей для дафний и других водных беспозвоночных. Помимо своей экологической функции, водоросли широко используются в современной биотехнологии; они находят существенные применения в медицине, косметике, пищевой промышленности, в роли биотоплива. Поэтому изыскание путей повышения скорости роста и выхода биомассы микроводорослей представляет серьезный практический интерес. В предшествующей авторской публикации [1] были представлены данные о стимуляции роста одной из практически важных микроводорослей – хлореллы – путем добавления в среду культивирования нейромедиаторов, а именно биогенных аминов дофамина, серотонина, гистамина.

В настоящей работе биогенные амины были проверены на их способность стимулировать или ускорять рост *Scenedesmus quadricauda*. Подобно хлорелле и ряду других микроводорослей, *Scenedesmus* допускает применение в фармацевтической и пищевой индустрии и в косметике. Наличие высокой концентрации ненасыщенных жирных кислот в биомассе способствует использованию *Scenedesmus* в качестве биотоплива (биодизеля). Биотехнологический интерес представляют продуцируемые *Scenedesmus* биологически активные вещества. включая антиоксиданты и УВ-протекторы астаксантин, β-каротин, микоспорины, спорополленин, витамины B, C, E, хлорофиллы *a, b, c* (применяемые как пищевые красители), а также антимикробные агенты, включая упомянутые жирные кислоты [2].

## Материалы и методы

*Scenedesmus quadricauda* культивировали на свету при постоянной аэрации при 24 °С в среде Тамия. В качестве инокулята использовали активно растущую культуру. которую разбавляли средой до конечной концентрации клеток $0.59\times10^6$ клеток/см$^3$ у *S. quadricauda*. Выбранные для анализа эффектов добавленных нейромедиаторов временные точки (1, 2, 4, 7 дней культивирования) соответствовали фазе задержки, ранней экспоненциальной фазе, поздней экспоненциальной фазе и стационарной фазе роста. соответственно. Экспериментальные системы содержали 1, 10 или 100 мкМ гидрохлоридов дофамина, гистамина, норадреналина или серотонина, которые добавляли при инокуляции. Клетки водоросли подсчитывали с помощью светового микроскопа (в его полях зрения). причем клетки *S. quadricauda* в пакетах (ценобиях) из 2–4 клеток подсчитывали как свободно лежащие одиночные клетки. Было проведено 4–5 независимых повторений каждого эксперимента; результаты были статистически обработаны и рассчитаны средние значения и стандартные отклонения.

## Результаты и обсуждение

Серотонин в концентрациях 1 и 10 мкМ вызывал примерно 30%-ное увеличение биомассы *S. quadricauda*, судя по результатам подсчета клеток этой микроводоросли (данные относятся к 7 дню культивирования). Эта стимуляция не наблюдалась при концентрации серотонина 100 мкМ. Для сравнения: серотонин статистически достоверно влиял на рост *C. vulgaris* только в концентрации 10 мкМ [1], причем вызванная им стимуляция роста была менее значительной (около 12% контроля).

Гистамин в случае *S. quadricauda* оказался наиболее эффективным стимулятором роста (из числа тестированных нейромедиаторов) при всех испытанных его концентрациях, причем максимальная (65%-ная) стимуляция накопления биомассы наблюдалась при 10 мкМ гистамина. Увеличение прироста числа клеток проявлялось уже на ранних стадиях роста; но оно было наибольшим к концу периода культивирования. В отличие от *S. quadricauda*, рост хлореллы не стимулировался максимальной испытанной концентрацией гистамина (100 мкм); более того, он оказывал в данной концентрации ингибирующее влияние на рост культуры к концу ее культивирования [1].

Дофамин статистически достоверно увеличивал число клеток в культурах *S. quadricauda* в испытанных концентрациях 1 и 10 мкМ, причем стимулирующий эффект составлял, на 7 день культивации, 36% (1 мкМ дофамин) и 45% (10 мкМ дофамин). У *S. quadricauda*, как и у хлореллы, 100 мкМ дофамин не вызывал рост-стимулирующего эффекта; предположительно, другой, ингибирующий, эффект, вызванный этой концентрацией дофамина, превзошел его ускоряющий эффект.

Норадреналин отличается от дофамина лишь одной гидроксигруппой в боковой углеродной цепи. Его стимулирующий эффект на рост *S. quadricauda* составлял около 30% в концентрациях 1 и 10 мкМ и полностью отсутствовал в концентрации 100 мкМ.

Таким образом, концентрации 1-10 мкМ всех испытанных нейромедиаторов стимулируют рост микроводоросли *S. quadricauda,* подобно тому, как они стимулировали рост *C. vulgaris* в ранее опубликованной работе [1]. Наиболее эффективным стимулятором накопления биомассы микроводорослей из числа испытанных нейромедиаторов оказался гистамин.

Водные экосистемы обычно содержат беспозвоночных, которые выделяют нейрохимические вещества (обзор, [3]). Стресс и травмы, возникающие в результате, например, нападений хищников или межиндивидуальных конфликтов, увеличивают выработку гистамина, серотонина и, часто, катехоламинов зоопланктоном. Ожидается, что эти продукты стресса будут способствовать росту водорослей в естественных водоемах.

В биотехнологическом плане полученные данные имеют определенные перспективы в отношении разработки экономичного метода увеличения производства биомассы водорослей. В частности, эта область исследований представляет потенциальный практический интерес в связи с будущими космическими путешествиями. Поскольку солнечный свет является единственным доступным источником энергии в космосе, выращивание фотосинтезирующих организмов, таких как микроводоросли, представляется осуществимым и экономичным проектом на борту космического корабля. Биогенные амины можно было бы использовать во время длительного космического перелета для увеличения выхода биомассы водорослей. Вся процедура, вероятно, была бы достаточно экономичной, учитывая низкую стоимость незначительных (микромолярных) концентраций нейромедиаторов даже при сравнительно большом объеме культиватора водорослей.

## Литература

1. *Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang Cao.* Impact of biogenic amines on the growth of a *Chlorella vulgaris* culture // Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. 2021.V. 11. P. 1–5.
2. *Ishaq A., Peralta H.M.M., Basri H.* Bioactive compounds from the green microalga *Scenedesmus* and its potential applications: a brief review // Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science. 2016. V. 39(1). P. 1–16.
3. *Грицай О.Б.* Поведение насекомых: роль биогенных аминов. М.: АЛЬТЕКС, 2017


# Использование биоэлектрохимических систем в качестве биосенсора для детекции роста концентраций соединений серы и органических субстратов


*Павлова П.А., Панкратова Е.В., Худокормов А.А., Волченко Н.Н., Самков А.А.*

Кубанский государственный университет, Polinatian777@gmail.com



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38032


Загрязнение водных объектов представляет собой важную проблему, причем химико-аналитические методы могут быть недостаточно пригодны, ввиду привязки к лаборатории. В связи с этим, вопрос создания автономных систем биоиндикации является наиболее актуальным, а рассмотрение использования микроорганизмов в качестве биосенсора является важной частью решения. Основой биосенсоров является микробный топливный элемент (МТЭ) безмембранного и мембранного типов, разработанных кафедрой генетики, микробиологии и биохимии. Микробный топливный элемент – биотехнологическое устройство, вырабатывающее электричество путем преобразования энергии химических связей микроорганизмами, с выводом избытка заряда во внешнюю цепь.

Цель работы: разработка метода определения концентраций соединений серы и органических субстратов в водной среде на основе биосенсоров. Определение концентраций любых поллютантов в водной среде может производиться с помощью биоэлектрохимических систем на основе электрогенных микроорганизмов. Микробные сообщества утилизируют органические вещества, за счёт чего образуется электричество. Избыток заряда выводится во внешнюю цепь [1] и может быть использован в качестве индикатора увеличения или снижения концентраций, как неорганических, так и органических веществ в водной среде. Предполагается, что МТЭ будут реагировать на внесение как малых, так и больших концентраций соединений серы[2] и органических веществ.

В мембранные МТЭ воздушнокатодного типа, анодная зона которых заполнена модельной сточной водой [3], внесли неорганические поллютанты $Na_2S$ и $MgSO_4$ в концентрациях 10 и 50, а также 100 и 500 мг/л, в пересчете на серу:

*Таблица 1*

**Зависимость суммарного количества электричества и максимальных показателей тока МТЭ от концентрации соединений серы**

| Показатель | Контроль | $Na_2S$, мг/л S | | | | $MgSO_4$ мг/л S | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 | 50 | 100 | 500 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| Q, Кл | 5,5 | 7,9 | 10,7 | 10.9 | 6,9 | 12,6 | 17,0 | 21,9 | 25,6 |
| I max, мкА | 28,9 | 19,6 | 93,4 | 78,5 | 38,4 | 58,1 | 73,1 | 68 | 46,8 |
| I max(ср), мкА | 18.7 | 14,3 | 55,1 | 36 | 16,7 | 41,9 | 55,9 | 55,45 | 25,2 |

Рассматривая внесение $Na_2S$ (табл. 1), можно сказать, что при концентрациях 10 и 500 мг/л, суммарное электричество составило 7,9 Кл и 6,9 Кл соответственно, по сравнению с контролем эти значения в 1,43 и 1,25 раз больше, а при 50 и 100 мг/л, эти значения составили 10,7 Кл и 10,9 соответственно, что показывает увеличение электрогенеза в 1,94 и 1,98 раза. При внесении $MgSO_4$ наблюдалось значи-

тельное увеличение суммарного электричества, при 10 мг/л – 12,6 Кл и значит в 2,29 раз больше контроля, 50 мг/л – 17 Кл в 3 раза больше, 100 мг/л – 21,9 Кл в 3,98 раза больше, а также 500 мг/л – 25,6 Кл в 4,65 раза больше. Следовательно, детекция роста концентрации для соединений серы в пределах до 500 мг/л осуществляется увеличением электрогенеза.

Для создания градиента концентрации органического соединения (мелассы) три сосуда объемом 800 мл, заполненные модельной сточной водой, были соединены. Внесение 4,5 г мелассы в первый сосуд привело к возникновению градиента концентрации, зафиксированного ростом напряжения МТЭ-биосенсоров, помещенных в каждый из сосудов.

*Таблица 2*

**Динамика изменения показателей напряжения МТЭ в зависимости от времени после внесения мелассы**

| Сосуд | Напряжение до внесения, мВ | Напряжение через 1 час, мВ | Напряжение через 24 часа, мВ | Напряжение через 48 часов, мВ |
|---|---|---|---|---|
| I | 77 | 90 | 185 | 443 |
| II | 80 | 83 | 138 | 322 |
| III | 75 | 77 | 79 | 201 |

Исходя из указанных в табл. 2 данных можно утверждать, что через 1 час после внесения мелассы электрогенез биосенсоров во всех трех сосудах, в зависимости от локализации органического соединения увеличился в 1,16; 1,03; 1,02 соответственно. Через 24 часа напряжение МТЭ изменилось в 2,4; 1,73; 1,05 раз, а через 48 часов в 5,75; 4; 2,68 раз. Увеличение электрогенеза через несколько часов после внесения соединения может говорить о высокой чувствительности биосенсоров к органическим веществам в водной среде.

Биосенсоры чувствительные к неорганическим и органическим соединениям могут быть основой для создания совершенно новых прототипов устройств детекции субстратов в водных средах.

## Литература


1. *Yun Y., Lee E., Kim K., Han J.* Sulfate reducing bacteria-based wastewater treatment system integrated with sulfide fuel cell for simultaneous wastewater treatment and electricity generation // Chemosphere. 2019. V. 233. P. 570–578.
2. *Baogang Z., Jing Z., Ye L., Chunbo H., Caixing T., Chuanping F., Zhongfang L., Wenli H., Zhenya Z.* Identification of removal principles and involved bacteria in microbial fuel cells for sulfide removal and electricity generation // International Journal of Hydrogen Energy. 2013. V. 38. I.33. P. 1434–1435.
3. *Ghangrekar M.M., Shinde V.B.* Performance of membrane-less microbial fuel cell treating wastewater and effect of electrode distance and area on electricity production // Bioresource Technology. 2007. V. 97. P. 2879–2885.


# Скрининг ростовых показателей и поверхностно-активных свойств штаммов *Rhodococcus erythropolis* B2 и *Shewanella oneidensis* MR-1, выращенных на различных питательных средах


*Петрова А.П., Волченко Н.Н., Самков А.А., Худокормов А.А.*

Кубанский государственный университет, olovyannikovasasha@mail.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38033


На сегодняшний день для решения актуальной экологической проблемы загрязнения экосистем нефтепродуктами активно используются биологические методы ликвидации углеводородных загрязнений, основанные на метаболическом потенциале нефтеокисляющих микроорганизмов, одним из которых

является *Rhodococcus erythropolis* B2. Однако в отсутствии гидрофобных источников углерода, данные микроорганизмы способны ассимилировать гидрофильные, значительно сокращая выделение из своих клеток биогенных поверхностно-активных веществ. В то же время, один из биотехнологически ценных электрогенных штаммов *Shewanella oneidensis* MR-1 не обладает способностью диспергировать углеводородные соединения и поэтому использует в качестве субстрата только гидрофильные соединения. Этот факт позволяет объединять данные группы микроорганизмов для разработки методов усовершенствования работы микробных топливных элементов в присутствии углеводородных соединений, что, в первую очередь, приводит к необходимости поиска универсального источника углерода и энергии для обоих исследуемых штаммов.

Целью нашей работы являлось сравнение показателей роста и поверхностно-активных свойств жидких культур штамма нефтедеструктора *Rhodococcus erythropolis* B2 и штамма-анодофила *Shewanella oneidensis* MR-1 при росте на средах с гидрофильными источниками энергии.

В качестве объектов исследования были отобраны вышеуказанные штаммы из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биохимии Кубанского государственного университета. В качестве гидрофильных источников углерода и энергии при росте на жидкой минеральной питательной среде использовали в сравнении сахарозу и лактат кальция. В ходе работы ростовая активность оценивалась измерением оптической плотности жидких культур выбранных штаммов при длине волны 670 нм. Концентрацию биомассы в разные периоды роста определяли гравиметрически. Для измерения уровня поверхностного натяжения был выбран метод отрыва пластинки от поверхности жидкости.

Анализ оптической плотности показал, что для обоих штаммов характерен более активный рост при культивировании на минеральной среде с добавлением сахарозы, нежели лактата – 0,953 и 0,918 усл. ед. на седьмые сутки у *Rh. erythropolis* B2 и *Sh. oneidensis* MR-1 соответственно. Анализ поверхностно-активных свойств жидких культур показал, что минимальный уровень поверхностного натяжения в 50,3 мН/м был отмечен для *Rh. erytrhopolis* B2 и 53,5 мН/м для *Sh. oneidensis* MR-1 при росте на сахарозе. Величина концентрации биомассы оказалась наибольшей при культивировании на минеральной среде с добавлением лактата кальция и равна 1,4 и 2,1 г/л на седьмые сутки роста для нефтеокисляющего и электрогенного штаммов соответственно.

Данные результаты указывают на то, что сахароза является более универсальным гидрофильным источником углерода и энергии для обоих выбранных штаммов, что открывает возможность их пробного совместного культивирования в дальнейших исследованиях.

## Дрожжи *Yarrowia lipolytica* как перспективный объект биотехнологических производств

*Пирожкова И.С., Пермякова И.А*

Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
ispir.2001@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38034

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются одним из перспективных объектов биотехнологии. Данные микроорганизмы принадлежат к семейству *Hemiascomycetes* и представляют собой так называемые нетрадиционные дрожжи, филогенетически далекие от хорошо изученных *Saccharomyces cerevisiae*.

Дрожжи *Y. lipolytica* характеризуются диморфизмом. Клетки могут иметь круглую или удлиненную форму, способны образовывать псевдомицелий и септированные гифы (рис. 1). Размножение происходит путем почкования. На агаризированной питательной среде Ридер на 4 сутки наблюдается рост матовых непрозрачных колоний молочно-белого цвета. Колонии диаметром 3–6 мм имеют преимущественно круглую форму, края ровные, возможно образование складок и концентрических кругов. Колонии мягкие, пастообразные, имеют выпуклый профиль и приподнимаются над плоскостью среды.

Данный вид дрожжей обладает способностью расти в различных средах, таких как промышленные и коммунальные стоки, морская вода, водоемы, загрязнённые нефтью [1].

В качестве субстрата дрожжи *Y. lipolytica* могут использовать глюкозу, этанол, глицерин, парафины нефти и растительные масла. Продуктами биотрансформации субстратов являются ценные метаболиты, включающие в себя органические кислоты, внеклеточные белки, восковые эфиры, длинноцепочечные диациды, этиловые эфиры жирных кислот, каротиноиды и омега-3 жирные кислоты [2].

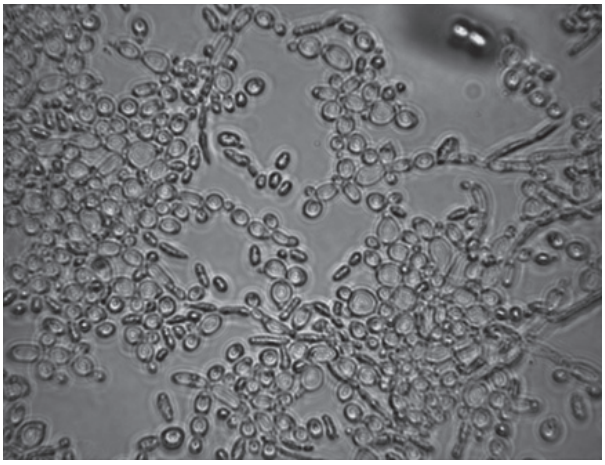


**Рис. 1.** Клетки дрожжей Yarrowia lipolytica при увеличении в 400 раз

Существует ряд преимуществ использования дрожжей *Y. lipolytica* в качестве продуцента в биотехнологическом производстве. К ним можно отнести устойчивость культуры к агрессивным компонентам среды-спиртам, кетонам, альдегидам и кислотам, рост в широком диапазоне pH, гало- и алкало толерантность. Благодаря этим характеристикам, а также склонности к утилизации гидрофобных соединений дрожжи *Y. lipolytica* могут применятся для биологической очистки кормовых ингредиентов [3]. Кроме того, данные микроорганизмы характеризуются высокой скоростью роста, активной секрецией липазы, протеазы и фосфатазы, эффективно выделяют белки во внешнюю среду, не обладают патогенными свойствами для людей и окружающей среды и достаточно устойчивы к посторонней микрофлоре [2].

На протяжении долгого времени дрожжи *Y. lipolytica* использовались в качестве продуцента кормового белка с высоким показателем питательности, который применялся в животноводстве. Культивирование осуществлялось на среде с парафинами нефти в качестве источника углерода [3].

В настоящее время одним из перспективных направлений использования дрожжей *Y. lipolytica* является биотрансформация глицеринсодержащих отходов биодизельного производства в продукты с добавленной стоимостью. Данная технология позволит повысить рентабельность производства биодизеля – экологичного безопасного топлива с высоким цетановым числом.

Продукты биотрансформации глицерина дрожжами *Y. lipolytica* включают в себя органические кислоты, эритрит, маннит и липиды [4]. Одним из ценных метаболитов является лимонная кислота, применяющаяся во многих областях промышленности.

Было проведено исследование образования лимонной кислоты при выращивании культуры дрожжей в среде, содержащей 1,5% мас. глицерина (рис. 2). В течение первых 5 суток наблюдается рост продуцента, культура выходит на фазу экспоненциального роста, накопление лимонной кислоты в среде не значительно. Активное образование продукта начинается при выходе культуры на стационарную фазу роста. Максимальный выход лимонной кислоты в данных условиях 1,2 г/л за 14 суток.

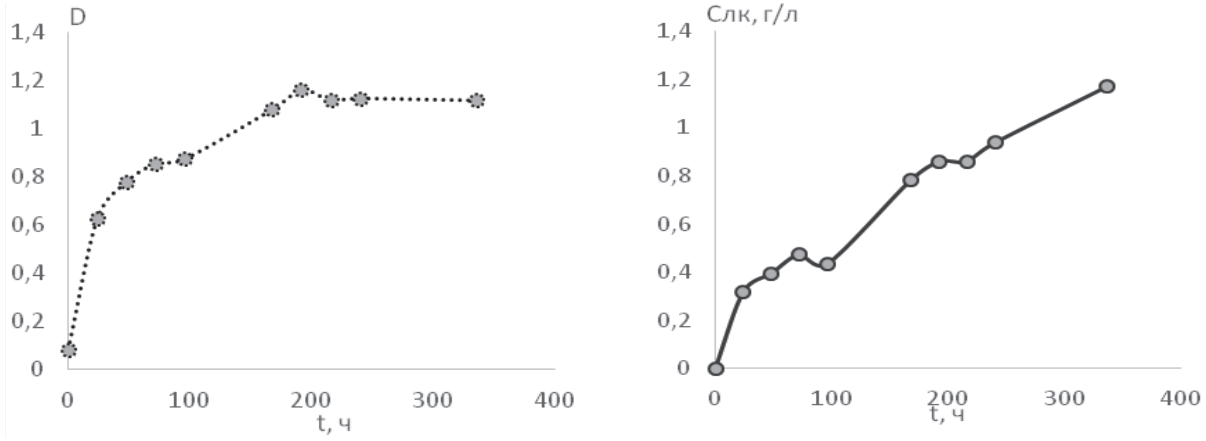



**Рис. 2.** Зависимость изменения оптической плотности D и концентрации лимонной кислоты Слк, г/л от времени t, ч

За время исследования концентрация лимонной кислоты достигла значения 1,2 г/л, но процесс ее продукции, вероятнее всего, не был завершен, что требует дальнейшего исследования. Изучение особенностей образования лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* позволит проводить промышленное культивирование в оптимальном режиме.

## Литература


1. *Yarrowia lipolytica*: модельные дрожжи для производства лимонной кислоты, исследование дрожжей / Cavallo E., Charreau H., Cerrutti P., Foresti M.L., // FEMS.- 17(8)-2017.
2. Патент №2 096 461 C1 Российская Федерация, МПК C12P 7/48 C12N 1/16 C12R 1/73. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцент лимонной кислоты и способ получения лимонной кислоты / Финогенова Т.В., Шишканова Н.В., Странео П., Моретти Э. Патентообладатели: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (RU), Акционерное общество «Прессиндустрия С.п.А.» (IT) № 93039858/13, заявл.04.08.1993 опубл. 20.11.1997.
3. Патент № 2664476 C1 Российская Федерация, МПК C12N1/19 C12N9/16. Рекомбинантный штамм *Yarrowia lipolytica* – продуцент инкапсулированной фитазы obesumbacterium proteus / Эпова Е.Ю., Дерябина Ю.И., Исакова Е.П., Трубникова Е.В., Трубников Д.В., Зылькова М.В., Бирюкова Ю. К., Тыньо Я.Я., Клявс Ю.П. Патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный университет», заявл. 14.07.2017. опубл. 17.08.2018.
4. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains / André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. Papanikolaou, S. // Eng Life Sci. –2009. – № 9. – P. 468-478.


# Безмедиаторное окисление глюкозы мембранными фракциями *Gluconobacter oxydans*


*Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетилов А.Н.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
plekhanova@ibpm.pushchino.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38035


В связи с постепенным истощением природных источников нефти и газа ведется активный поиск создания альтернативных источников энергии. Интерес к разработке микробных топливных элементов (МТЭ) обусловлен с одной стороны тем, что в них осуществляется прямое превращение химической энергии различных соединений в электрическую, а с другой стороны в качестве этих химических соединений можно использовать отходы производств. При этом будет происходить не только выработка энергии, но и очистка окружающей среды.

Работа биоэлектрохимических устройств основана на переносе электронов от активных центров ферментов в составе биорецепторного элемента, иммобилизованного на поверхности электрода, непосредственно на электрод. Для обеспечения эффективности этого процесса применяют специальные реагенты – медиаторы (диффузионно-подвижные переносчики электронов). При практическом применении биосенсоров и биотопливных элементов важной характеристикой является безреагентность – т.е. отсутствие необходимости введения дополнительных соединений при выполнении анализов.

Для целых клеток *Gluconobacter oxydans* эффект безмедиатороного переноса электронов на электрод не был обнаружен. Альтернативой использованию целых клеток в качестве биокатализаторов биосенсоров является использование их мембранных фракций, в которых ферментные комплексы сохраняются в активном состоянии. Бактерии *Gluconobacte*r *oxydans* содержат мембраносвязанные дегидрогеназы, которые катализируют окисление ряда низших спиртов и сахаров.

Целью настоящей работы являлось изучение возможности и условий безмедиаторного биоэлектрокаталитического окисления глюкозы мембранными фракциями бактерий *Gluconobacter oxydans*.

Основу составляли графитовые матричные электроды. Для улучшения их электрохимических свойств использовали модификацию биосовместимым углеродным наноматериалом – терморасширенным графитом. Для обеспечения плотного контакта между поверхностью электрода и активным центром фермента применили проводящий полимер ПЭДОТ:ПСС ((поли(3,4-этилендиокситиофен): полистиренсульфоновая кислота).

Было показано, что при иммобилизации мембранных фракций в составе электрода, модифицированного наноматериалом и проводящим полимером, электроокисление глюкозы может протекать в отсутствие искусственных окислительно-восстановительных медиаторов переноса электронов. Исследование хроноамперометрических и циклических вольтамперометрических характеристик показало увеличение анодного тока при электродных потенциалах в диапазоне 0–500 мВ относительно электрода сравнения.

Эффект прямого переноса электронов был обнаружен для немодифицированного ПЭДОТ:ПСС, а также для ПЭДОТ:ПСС, связанного сшивающими агентами и проводящими наполнителями, такими как полиэтиленгликоль диглицидиловый эфир (ПЭГДЭ) или диметилсульфоксид (ДМСО). Внесение в состав геля ПЭДОТ:ПСС дополнительных сшивающих реагентов приводило к снижению сопротивления переноса заряда электрода, уменьшению отрицательного влияния на биокатализатор, увеличению амплитуды сигнала биосенсора и увеличению чувствительности к глюкозе.

Коэффициент чувствительности представленного биосенсора к глюкозе при дополнительной модификации ПЭДОТ:ПСС увеличивается с 6.6 до 11.4 (в случае ДМСО) и 11.7 мкА×мМ$^{-1}$×см$^{-2}$ (в случае ПЭГДЭ). Время измерения пробы глюкозы составило 2 минуты, что может быть важно при проведении экспресс-анализов. Использование в качестве биоматериала мембранных фракций бактериальных клеток, а не ферментов, позволяет избежать дорогостоящего этапа очистки белка.

Представленная стратегия может быть применена при разработке безреагентных биотопливных элементов. Отсутствие медиаторов позволит не загрязнять окружающую среду при эффективной работе МТЭ.

## Сравнительная характеристика стероид-трансформирующей активности грибов деструкторов темперной живописи

*Потапов М.П.[1,2], Кардонский Д.А.[3], Карпова Н.В.[1], Ядерец В.В.[1], Стыценко Т.С.[1], Нураева Г.К.[1], Авданина Д.А., Жгун А.А.[1]*

[1] ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва, mrk9804@gmail.com
[2] Пущинский государственный естественно-научный институт, Московская область, г. Пущино
[3] ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38036

Биотрансформация с использованием микроорганизмов является важным технологическим этапом в промышленном синтезе биологически активных стероидных молекул. Лекарственные препараты, созданные на их основе, являются самыми продаваемыми на фармацевтическом рынке после антибиотиков, а их количество на 2018 год превысило 300 единиц [1]. Использование микроорганизмов в процессе синтеза и последующее снижение стоимости конечного продукта позволило сделать стероидные лекарства одними за самых доступных для потребителя. Хорошим примером служит кортизон, стоимость которого сократилась с 200$/г до 1$/г после внедрения стадий биотрансформации с *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 и *Aspergillus niger* ATCC 9142 в технологический процесс [2].

В живых системах важнейшие реакции биотрансформации, возможны благодаря наличию ферментов способных осуществлять регио- и/или стереоспецифичные реакции, которые трудно осуществи-

мы при чисто химическом синтезе. Среди ферментов, трансформирующих стероиды одними из важнейших являются цитохромы P450 (CYP 450), способные проводить различные реакции модификации стероидов в том числе окислительное гидроксилирование, галогенирование, эпоксидирование и другие [3,4]. Для поиска важных реакций трансформации одним из наиболее перспективных видится царство грибов (где обнаружено наибольшее разнообразие CYP 450, ~400 семейств) [5]. CYP 450 мембранносвязанные белки, располагаются на мембране эндоплазматического ретикулума или на внутренней мембране митохондрий. Для их работы необходимы дополнительные белки-партнеры по электрон передающей цепи, такие как NADPH-зависимая P450-редуктаза [3]. В промышленности такую систему трудно реализовать *ex vivo,* поэтому используют мицелиальные грибы, способные катализировать интересующие реакции.

В 2018 году были выделены мицелиальные грибы, для которых продемонстрировали наличие способности расти на лакокрасочных материалах, используемых в темперной живописи [6], в том числе на темперных красках. Темперные краски получают на основе яичного желтка, являющегося одним из самых богатых источников холестерина в природе (до 2-х % от сухой массы). В связи с этим данные грибы являются перспективными объектами для поиска разнообразных стероид трансформирующих активностей.

В нашей работе определили наличие стероид-трансформирующей активности у 10-ти штаммов мицелиальных грибов, отобранных с поверхностей экспонатов темперной живописи и поверхностей залов основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (Москва, Лаврушинский переулок, 10) и охарактеризованных филогенетически по межгенным участкам рДНК: *Aspergillus versicolor* STG-25G, *Ulocladium sp.* AAZ-2020a STG-36, *Cladosporium halotolerans* STG-52B, *Aspergillus creber* STG-57, *Aspergillus versicolor* STG-86, *Aspergillus creber* STG93W, *Cladosporium parahalotolerans* STG-93B, *Simplicillium lamellicola* STG-96, *Microascus paisii* STG-103 и *Aspergillus protuberus* STG-106. Активность определяли в состоянии роста культур на среде F (г/л: сахароза 30, дрожжевой экстракт 5, $NaNO_3$ 2, $(NH_4)$ $H_2PO_4$ 3, KCl 0.5, $MgSO_4$ x $7H_2O$, pH 5,5–6,0) по отношению к андростендиону (АД) и андростендиендиону (АДД) и в 0.15 М калий-фосфатном буфере (pH = 6.0) по отношению к АД. Отбор проб проводили через 24, 48, 72 ч после внесения в питательную среду АД и АДД. Стероиды экстрагировали из проб этилацетатом и анализировали методами тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Для идентификации соединений по полученным масс-спектрам использовали базы данных NIST 2014 (DOI:10.1007/s13361-016-1589-4) и Reaxys (https://www.reaxys.com). В качестве контроля использовали промышленной штамм *C. lunata* ВКПМ-F981.

Все исследованные мицелиальные грибы продемонстрировали стероид-трансформирующую активность. Были замечены существенные различия в активности при трансформации АД в питательной среде по сравнению с трансформацией АД в буфере. В питательной среде штаммы STG-25 и STG-86 селективно трансформировали АД в тестостерон, в буфере такой активности не было. Для штамма STG-57 были различия в соотношении продуктов трансформации и степени потребления субстрата, качественный состав продуктов не имел значимых отличий. Штамм STG-93W имел схожий профиль продуктов трансформации, однако при росте на питательной среде образовывал 6β-OH-АД, в буфере образовывал 6β-OH-ТС. Штамм STG-106 продемонстрировал качественные различия – среди продуктов трансформации АД в буфере были андростан-3,11,17-трион, 6β-OH-ТС и другие вещества, которые не обнаружены при трансформации АД в питательной среде. Одним из самых активных штаммов оказался STG-96, который продемонстрировал существенные различия как в качественном составе продуктов, так и в их количественном соотношении, например, при трансформации в питательной среде, по сравнению с трансформацией в буфере, данный штамм образовывал 7α-OH-АД, обладающий диуретической активностью [7], 6β-OH-АД и 5β-H-андростан-3,6,17-трион. Штамм STG-52B активнее потреблял АД при росте на питательной среде, тогда как в буфере продемонстрировал способность к образованию тестостерона. Штамм STG-93B в питательной среде образовывал 15α-OH-АД, 6β-OH-АД и более активно потреблял АД, по сравнению с трансформацией в буфере. STG-36 при росте на питательной среде показал способность образовывать только восстановленные продукты трансформации – 3α-OH-5β-H-андростан-17-он и 5β-H-андростан-3,17-дион, тогда как при трансформации в буфере данный штамм вместе с этими веществами образовывал 14α-OH-АД и тестостерон. При трансформации АДД штаммы STG-25, STG-106, STG-93B продемонстрировали 14α гидроксилирующую активность, при трансформации АД ее обнаружено не было. При трансформации АДД штамм STG-93W продемонстрировал 17β редуктазную активность.

В данной работе мы впервые показываем, что грибы-деструкторы темперной живописи обладают различной стероид-трансформирующей активностью в зависимости от условий среды и трансформируемого субстрата и могут использоваться для дальнейшего скрининга перспективных трансформаций.

## Литература


1. *Fernández-Cabezón L., Galán B., García J.L.* New insights on steroid biotechnology // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9, № MAY.
2. *Carballeira J.D. et al.* Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions // Biotechnology Advances. Elsevier, 2009. Vol. 27, № 6. P. 686–714.
3. *Tong W.-Y., Dong X.* Microbial Biotransformation: Recent Developments on Steroid Drugs // Recent Pat. Biotechnol. Bentham Science Publishers Ltd., 2009. Vol. 3, № 2. P. 141–153.
4. *Brixius-Anderko S.* Biotechnological application of steroidogenic Cytochromes P450. 2016. P. 128.
5. *Durairaj P., Hur J.S., Yun H.* Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases // Microbial Cell Factories. BioMed Central Ltd., 2016. Vol. 15, № 1. P. 1–16.
6. *Zhgun A. et al.* Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. Public Library of Science (PLoS), 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
7. *Kozłowska E. et al.* Isaria fumosorosea KCh J2 Entomopathogenic Strain as an Effective Biocatalyst for Steroid Compound Transformations // Mol. 2017, Vol. 22, Page 1511. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 22, № 9. P. 1511.


# Оценка фитопатогенности бактерий *Bacillus Velezensis*


*К.А. Роденко[1], Д.Л. Басалаева[1], М.И. Никельшпарг[1], Евстигнеева С.С.[2], Глинская Е.В.[1]*

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
mailto:rodenko-ksenia@yandex.ruKsenia-Rodenko@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38037


В последние несколько лет отрасль сельского хозяйства все чаще сталивается с проблемой дефицита биологически безопасных аналогов пестицидов синтетического происхождения, не наносящих вред живым организмам и окружающей среде. Бактерии рода *Bacillus* способны продуцировать большое количество экзоферментов из класса гидролаз, осуществляющих расщепление полисахаридов, полипептидов и жирных кислот. Однако часть таких экзометаболитов в процессе онтогенеза могут угнетать развитие и рост растений. В связи с этим, при отборе штаммов бактерий, перспективных для создания биопрепаратов, направленных на биоконтроль фитопатогенов сельскохозяйственных культур, учитывают его биобезопасность и отсутствие фитотоксического действия.

Целью исследования являлось определение способности штамма *Bacillus velezensis* 13 к синтезу гидролитических экзоферментов, мацерации и некрозу растительной ткани как факторов фитопатогенности.

Объектом исследования являлся штамм *Bacillus velezensis* 13, выделенный с поверхности листьев ястребинки могучей *Hieracium robustum* Fr. s. L., 1848 в 2018 году [1].

Определение ферментативной активности проводили методом высева исследуемого штамма на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с источниками специфических субстратов. В качестве субстратов использовали: обезжиренное молоко – протеолитические ферменты, растворимый крахмал – амилолитические ферменты, порошковую целлюлозу – целлюлолитические ферменты, растворимую целлобиозу – β-глюканазные ферменты, яблочный и свекловичный пектины – пектинолитические ферменты. Посев исследуемой культуры осуществляли уколом и инкубировали при температуре 30 °С в течение 7 суток. Учет результатов проводили на 3, 5 и 7 сутки культивирования. О ферментативной активности судили по диаметру зон гидролиза субстрата. Для визуализации зон гидролиза

крахмала, целлюлозы и целлобиозы использовали раствор Люголя, а для пектинов – 0,05%-ный спиртовой раствор бромтимолового синего [2, 3].

Оценку способности к мацерации исследуемого штамма *B. velezensis* 13 проводили по стандартной методике. В стерильные чашки Петри раскладывали диски фильтровальной бумаги, смачивали стерильным физиологическим раствором. На поверхность помещали диски стандартных тест-объектов диаметром 1 см и толщиной 0,5 см: клубни картофеля и корнеплоды моркови и свеклы. Исследуемую культуру петлей наносили на поверхность растительных тканей и инкубировали при температуре 28 °С в течение 48–72 ч. Оценку фитопатогенного влияния проводили визуально и касанием петли.

Определение способности штамма *B. velezensis* 13 к некрозу растительных тканей проводили по стандартной методике. В стерильные чашки Петри раскладывали листья *Nicotiana alata* Link & C. F. E. Otto, 1828. Готовили взвесь из суточной культуры исследуемого штамма в концентрациях: $10^9$, $10^8$, $10^7$, $10^6$ и $10^5$ м.к./мл. Далее суспензию клеток бактерий в объеме 0,1 мл стерильным шприцом вводили в центральную жилку листа. Инкубировали при температуре 18–20 °С в течение 72 ч при поддержании смены светового режима. Реакцию гиперчувствительности оценивали по появлению некротических зон почернения листовой пластинки [4].

Результаты определения ферментативной активности показали, что бактерии *B. velezensis* 13 обладают всеми изученными нами ферментными системами. В ходе 7-суточного культивирования исследуемого штамма на дифференциально-диагностических питательных средах наблюдалось увеличение ферментативной активности (рисунок).

Максимальная сахаролитическая активность наблюдалась по отношению к целлюлозе, свекловичному пектину и целлобиозе (49, 47 и 44 мм соответственно). Амилолитическая активность была несколько ниже, зона гидролиза крахмала к 7 суткам достигала 39 мм. Зоны гидролиза яблочного пектина достигали только 22 мм. Протеолитическую активность изучали по отношению к казеину, зона гидролиза которого составила 32 мм.

В ходе определения способности штамма *B. velezensis* 13 к мацерации было установлено, что исследуемый штамм мацерировал все исследуемые тест-объекты.

При оценке способности штамма *B. velezensis* 13 к некрозу было установлено, что исследуемый штамм 13 поражает тест-культуру растений в концентрациях $10^5$–$10^9$ м.к./мл.

Оценка полученных результатов позволяет утверждать, что бактерии штамма *B. velezensis* 13 отличаются выраженной ферментативной активностью по отношению к белкам, высокомолекулярным углеводам, жирным кислотам и способны к мацерации и некрозу растительных тканей.

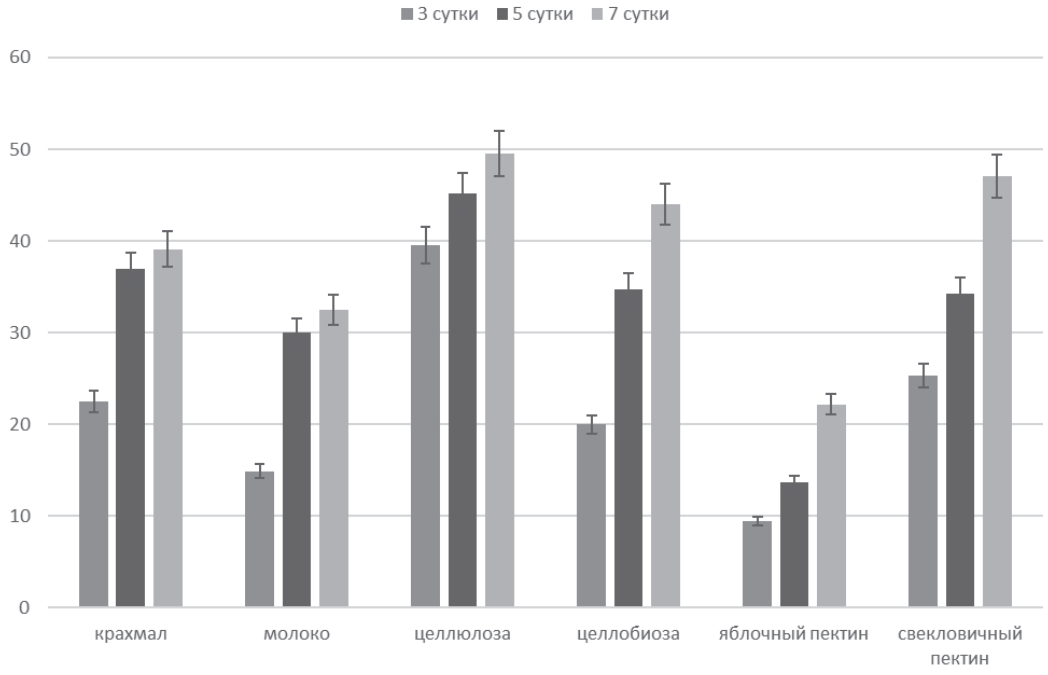



**Рис.** Ферментативная активность бактерий *B. velezensis* 13

## Литература

1. Антагонистические свойства бактерий *Bacillus velezensis* / Д.Л. Басалаева [и др.] – Сборник научных трудов «Живые системы-2019». Саратов: Амирит, 2019. – С. 171–173.
2. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF / L. Chen [et al.] // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 3. – P. 325–335.
3. creening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry / F. Rasul [et al.] // Int. J. Biosci. – 2015. – Vol. 6. – P. 230–38.
4. *Желдакова Р.А., Мямин В.Е.* Фитопатогенные микроорганизмы. – Минск: БГУ, 2006. – 89 с.


# Выделение и характеристика штаммов-продуцентов высокомолекулярных экзополисахаридов


*Сазонова О.И., Ветрова А.А., Соколов С.Л.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), sazonova_oi@rambler.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38038


Способность синтезировать внеклеточные полисахариды (ЭПС) различного состава и строения (от простейших гомополисахаридов до сложных гетерополисахаридов) широко распространена среди микроорганизмов и присуща представителям многих систематических групп. ЭПС обладают уникальными физическими, биологическими, химическими и механическими свойствами, благодаря которым они нашли широкое применение в фармацевтической, пищевой и нефтяной промышленностях. Поскольку для каждой отрасли требуются ЭПС с различными характеристиками, то целенаправленный поиск микроорганизмов, продуцирующих биополимеры, подбор условий для большего выхода необходимого продукта (методы и условия культивирования) и при этом снижение экономических затрат в биотехнологическом производстве является актуальным. Целью данной работы был поиск, выделение и характеристика бактериальных штаммов-продуцентов высокомолекулярных экзополисахаридов.

Для выделения штаммов микроорганизмов, потенциальных продуцентов внеклеточных полисахаридов, в качестве источника выделения использовали лесную подстилку, смешанную с верхним слоем почвы глубиной 3–5 см. Пробы отбирали в Приокско-Террасном заповеднике имени М.А. Заблоцкого. Отбор штаммов потенциальных продуцентов ЭПС проводили на среде R2A, поскольку известно, что на агаризованных питательных средах, синтезирующие ЭПС микроорганизмы, характеризуются слизистыми колониями. Чтобы подтвердить, что полученные изоляты продуцируют внеклеточные полисахариды, штаммы выращивали на минеральной среде с 5%-ной сахарозой, высаждали ЭПС из культуральной жидкости изопропанолом и с полученными препаратами, проводили реакцию Подобедова-Молиша (общая качественная реакция на углеводы). Два микроорганизма (2А и 4А) дали положительную реакцию на остаток сахара в образце. Видовую принадлежность выделенных штаммов-продуцентов ЭПС определяли с помощью матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и секвенированием фрагмента гена 16S рРНК. Оба штамма относятся к виду *Pantoea cypripedii*. Для представителей рода *Pantoea* sp. информация по продукции ЭПС встречается не часто. Известен штамм *Pantoea* sp. BM39, выделенный из седиментов Средиземного моря группой итальянских исследователей, который характеризовался высоким уровнем синтеза ЭПС на среде с глюкозой с добавлением микроэлементов (Silvi et al., 2013). Выход сухого продукта ЭПС за 24 часа культивирования на минеральной среде с 5%-ной сахарозой у штаммов *Pantoea cypripedii* 2А и 4А, выделенных в данной работе, составлял 11,8 г/л и 8,5 г/л, соответственно.

Определение молекулярно-массового распределения и средней молекулярной массы биополимеров проводили при помощи гель-проникающей хроматографии высокого разрешения. Результаты обработки хроматограмм образцов экзополисахаридов, синтезируемых штаммами *Pantoea cypripedii* 2А и 4А на минеральной среде с 5%-ной сахарозой представлены в табл. 1.

*Таблица 1*

**Результаты обработки хроматограмм образцов экзополисахаридов, синтезируемых штаммами *Pantoea cypripedii* 2А и 4А**

| Образец | Пик | Время выхода, мин | % площади | Молекулярная масса, Да |
|---|---|---|---|---|
| *Pantoea cypripedii* 4А | 1 | 11,00 | 23 | ~1690600 |
| | 2 | 21,09 | 55 | ~1750 |
| | 3 | 24,14 | 22 | 44 |
| *Pantoea cypripedii* 2А | 1 | 9,55 | 31 | ~3972400 |
| | 2 | 11,00 | 12 | ~1687700 |
| | 3 | 21,12 | 49 | ~1690 |
| | 4 | 23,22 | 7 | 150 |

Одним из основных показателей в описании свойств ЭПС является вязкость их растворов. Динамическая вязкость 10%-ного раствора внеклеточного полисахарида, продуцируемого штаммом *P. cypripedii* 2А при 30 °С, составила 1,652 мПа×с. Для *P. cypripedii* 4А этот показатель был 1,728 мПа×с.

Таким образом, штаммы *Pantoea cypripedii* 2А и 4А способны к продукции высокомолекулярных ЭПС в значительном объеме и могут быть использованы в промышленном производстве.

## Литература

1. *Silvi S, Barghini P, Aquilanti A, Juarez-Jimenez B, Fenice M.* Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide // Microb Cell Fact. 2013; 12:10. doi:10.1186/1475-2859-12-10

# Перспективы трансформации растений биоремедиантов генами грибных лакказ и дальнейшим применением в области биоремедиации почвы

*Саитгареева А.Л., Вершинина З.Р.*

ИБГ УФИЦ РАН (Институт биохимии и генетики РАН), *saitgareeva.anastasia@gmail.com*
ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет»

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38039

Поиск современных решений в области биоремедиации почв является актуальной задачей на сегодняшний день. Наряду с загрязнениями посевных участков различными пестицидами, почва подвергается воздействию других ксенобиотиков, в частности выбросам веществ фенольной природы. Накопление токсичных соединений не просто оказывает негативное влияние на окружающую среду, оно приводит к изменению состояния экосистемы в целом, к изменению микробиоты почвы, снижению активность ферментов. Данные факторы напрямую влияют на эксплуатационные свойства, снижению плодородия. Чаще всего в России фенольные агенты присутствуют в почвах в регионах, занятых нефтяной и химической промышленностью.

В настоящее время продолжатся работа по изучению различных способов редукции фенольных поллюантов. Задействованы микроорганизмы, растения и грибы, способные внутри или внеклеточно перерабатывать загрязнители различной природы, также применяются сорбенты. Одним из перспективных методов очистки почв от фенольных и полифенольных производных является применение ферментов лакказ. Данные ферменты замечательны своей способностью деградировать многие высокотоксичные соединении, такие как бисфенол А, хлорфенол, алкилфенол и его производные, фосфоорганические пестициды. Лакказы окисляют вышеописанные соединения до соответствующих радикалов с образованием воды.

Функционирование растений с экспрессией генов грибных лакказ все еще изучается, однако, видимых нарушений в организации тканей не обнаружено. Таким образом доказано, что растения могут без вреда для себя синтезировать чужеродный фермент. Это дает зеленый свет другим исследованиям, связанных с применением трансформированных растений.

Данная группа оксиредуктаз синтезируется разнообразными организмами, их каталитическая активность проявляется в процессах окисления многих ароматических соединений. Самая высокая активность этих ферментов обнаружена у базидиальных грибов трутовиков, бактерии продуцируют менее активные ферменты, а растения используют их при синтезе лигнина.

Проблема использования бизидиомицетов для получения лакказ заключается в их длительном цикле развития. Ферментация длится от 10 до 14 суток, и в промышленных масштабах получение ценного фермента весьма энергозатратно. Использование свойств высокоактивных фенолредуцирующих ферментов более эффективным методом стало целью данной работы.

Результатами трансформации табачных растений генами лакказ *Coriolus versicolor* были испытания по удалению бисфенола А из среды. Секретируемые в ризосферу ферменты лакказ смогли удалить 20 мкмоль токсина на грамм сухого веса, что явно превышало показатели контрольного опыта.

Выгодным решением поставленной задачи также представляется клонирование гена лакказы трутового гриба *Fomes Fomentarius*, показавшего высокие показатели активности, и получение трансформированных данным геном растений фиторемедиантов. Подобные трансгенные растения смогут продуцировать новый фермент в почву, разрушая присутствующие в ней загрязнения. Для этого необходимо получить плазмиду, которая несет в одной рамке считывания лидерную последовательность секреции в корне и ген лакказы.

Нуклеотидная последовательность лигнолитического комплекса данного штамма не изучена. Амплификат лакказ у *Fomes Fomentarius* представлен последовательностью из 200-400 п.н. в зависимости от использованного праймера первый (LccF/LccR) – по референспоследовательности наиболее изученного объекта (*Trametes versicolor*), второй (1LccF/1LccR) – по последовательностям двух видов грибов рода *Trametes* (*T. hirsuta*). [12]

Таким образом перед научным сообществом стоят следующие задачи: определение нуклеотидной последовательности кодирующие лакказы *F. Fomentarius*, индуцирование гена лакказ в геном табака, изучение механизма действия нового фермента в растении, будет ли он внеклеточно разлагать фенолы непосредственно в почве, или внутриклеточно перерабатывать загрязняющие агенты и накапливать в вакуолях.

## Литература


1. *Поляк Ю.М., Сухаревич В.И.* Почвенные ферменты и загрязнение почв: биодеградация, биоремедиация, биоиндикация. – Агрохимия. – № 3. 2020 г. – С. 83–93.
2. *Tomonori Sonoki, Shinya Kajita, Seiichiro Ikeda, Mikiko Uesugi, Kenji Tatsumi, Yoshihiro Katayama, Yosuke Iimura*. Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants. – Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 67, P. 138–142 (2005).


# Получение рекомбинантных глюкогидролаз штамма *Streptomyces carpinensis*


*Сафронова М.Ю., Лисов А.В., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН),
marina-smailto:marinaslogiiin@yandex.ru-logiiin@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38040


В настоящее время ферменты получили широкое применение в пищевой, химической промышленности, а также в сельском хозяйстве, и медицине. Такие ферменты, как глюкогидролазы, используются

в ряде отраслей промышленности, ориентированных на переработку растительного сырья. Эндоксиланаза (К.Ф. 3.2.1.8) катализирует расщепление β-1,4-гликозидных связей в молекулах ксилана, который является основным компонентом гемицеллюлоз, входящих в состав клеточной стенки растений. При этом образуются олигосахариды с различной молекулярной массой. Также работает эндоглюканаза (целлюлаза) (К.Ф. 3.2.1.4), которая катализирует гидролиз β-1,4-гликозидных связей в молекуле целлюлозы растений с образованием олигосахаридов различной молекулярной массы. Оба этих фермента используются для увеличения питательной ценности кормов (осахаривания) для сельскохозяйственных животных. Ксиланазы применяются в пекарском деле, а также при отбеливании бумаги в целлюлозно-бумажной промышленности. Поиск и получение новых целлюлаз и ксиланаз является актуальным исследованием.

Для работы был выбран штамм *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300, который содержит гены, кодирующие 2 различные эндоксиланазы (WP_086728038.1, WP_086728555.1) и 2 различные эндоглюканазы (WP_086730120.1,WP_086729214.1), субстратами которых являются ксилан и целлюлоза, соответственно. В ходе работы интересующие нас гены были амплифицированы из генома *S. carpinensis* и клонированы в экспрессионный вектор. Для работы нами был выбран вектор pQE-30. После подбора подходящих сайтов рестрикции, была проведена рестрикция и лигирование исследуемых генов и вектора. Ген эндоглюканазы (WP_086730120.1) был обработан по сайтам рестрикции SacI и HindIII, остальные гены – по сайтам KpnI и HindIII. Затем лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* M15 (pRep4), после чего проводили ПЦР-проверку клонов-трансформантов на наличие необходимых вставок. Нами были клонированы два гена эндоксиланаз, а также один ген эндоглюканазы. Однако, при наработке и очистке эндоглюканазы было установлено, что весь белок выпадал в осадок. При экспрессии в штамме *E. coli* M15 (pRep4) наблюдалась высокая продукция белков эндоксиланаз, а также высокая ферментативная активность эндоксиланазы WP_086728038.1. Белок WP_086728555.1 обладал низкой активностью. Эндоксиланазы были очищены с использованием аффинной хроматографии на колонке HisTrap$^{TM}$FF с Ni-сефарозой.

Молекулярная масса фермента WP_086728038.1 согласно электрофореграмме, составила 38 кДа. Фермент эндоксиланаза WP_086728038.1 катализировал гидролиз ксилана при значениях pH 3–9. pH-оптимум фермента составил 6,0. Фермент сохранял начальную активность в течение 2 недель при хранении при +4°C.

Таким образом, нами была получена новая эндоксиланаза, исследованы некоторые физико-химические свойства фермента. Дальнейшая характеристика эндоксиланазы позволит установить, обладает ли полученный фермент биотехнологическим потенциалом.

## Поиск бактериофагов *B. pumilus sensu lato*, обладающих перспективными антибактериальными ферментами

*Скорынина А.В., Пилигримова Э.Г., Казанцева О.А., Шадрин А.М.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН;
s_an.net@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38041

Бактериофаги и их литические ферменты считаются многообещающими антибактериальными агентами. Многие исследования демонстрируют способность фагов и их белков уничтожать, частично или полностью, бактериальные биоплёнки и споры. Фаги и их компоненты также отличаются высокой селективностью по сравнению с обычными антибактериальными средствами и поэтому могут эффективно применяться в медицине, где целью является контроль определенных штаммов или видов бактерий. Недавно был охарактеризован новый бактериолитический фермент из бактериофага *B. pumilus* – гид-

ролаза клеточной стенки бактерий Ply67 [1]. Фермент обладает рядом выдающихся свойств, таких как споролитическая активность, стабильность в широком диапазоне температур и значений pH, а также широкая специфичность и активность в отношении спор видов группы *B. cereus*. Таким образом, мы предполагаем, что бактериофаги группы *B. pumilus* могут представлять интерес как источник новых бактериолитических ферментов.

Вид *B. pumilus sensu stricto (ss)*, входит в группу *B. pumilus*, также известную как *B. pumilus sensu lato* (*sl*), наряду с близкородственными видами *B. safensis*, *B. altitudinis*, *B. xiamenensis*, *B. zhangzhouensis* и *B. australimaris*.

Группа видов *Bacillus pumilus* обладает высокой устойчивостью к экстремальным условиям, таким как $H_2O_2$-опосредованный окислительный стресс, высокая концентрация соли, УФ, высокоскоростные ускорения и ионизирующее излучение. *B. pumilus s.l.* споры могут оставаться жизнеспособными в суровых условиях, имитирующих поверхность Марса. *B. safensis* и *B. pumilus s.s.* были обнаружены на месте сборки космического корабля Phoenix, который использовался для исследования поверхности Марса в 2008 году. Из-за высокой жизнеспособности *B. pumilus s.l.* широко используются в качестве эталонных микроорганизмов при определении эффективных доз облучения для целей стерилизации [2].

Целью данной работы стал поиск бактериофагов *B. pumilus s.l.*, синтезирующих перспективные бактериолитические ферменты.

Источниками фагов служили пробы земли разных городов Тульской области. После совместного культивирования бактерий с супернатантами образцов почв, были выделены два фага vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV. После трех пассажей на газонах *B. pumilus* были получены лизаты фагов с высоким титром и экстрагирована геномная ДНК. Выделенная ДНК была секвенирована с помощью технологии illumina. Последовательность генома собрана с помощью SPAdes v. 3.11.1. Аннотация проведена с помощью онлайн-серверов BLAST (NCBI) и HHpred.

На газонах чувствительного штамма оба фага образовывали прозрачные крупные бляшки, окруженные мутными кольцами, которые продолжали расширяться с течением времени (рис. 1). Считается, что такие ореолы могут возникать из-за деградации полисахаридов слизистых слоёв бактерий, опосредованной деполимеразами бактериофагов [3, 4, 5]. Благодаря меньшему размеру ферменты диффундируют в мягком агаре быстрее фагов и разрушают капсулы бактерий.

В геномах vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV были обнаружены гены, кодирующие деполимеразы суперсемейства Pectin_lyas_fold (код InterPro: IPR012334) (gp28 и gp31 в геномах vB_BpS_BLKV и vB_

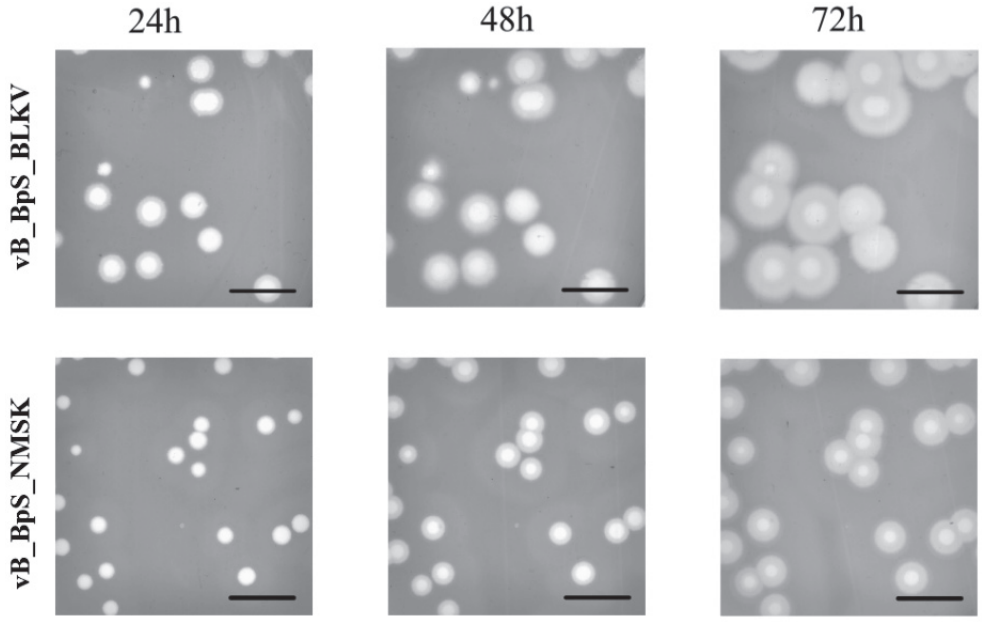



**Рис. 1.** Морфологическая характеристика негативных колоний фагов B. pumilus vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV. Штамм-хозяин смешивали с каждым фагом и высевали в двухслойный агар. Негативные колонии фотографировали через 24, 48 и 72 часа инкубации. Масштабная линейка – 1 см

BpS_NMSK соответственно). Gp28 содержит домен Pectate_lyase_SF_prot (IPR024535) в своей N-концевой части и домен Beta_helix (IPR039448) на С-конце, тогда как Gp31 имеет только домен Beta_helix в его С-концевой области. Анализ HHpred выявил высокое сходство Gp28 и Gp31 с доменами и белками суперсемейства Pectinlyase-like (SCOPe ID: b.80.1): значения вероятностей 99,81% и 99,7% соответственно, были получены для выравнивания с рамногалактуроназой А *Aspergillus aculeatus* (SCOPe ID: d1rmga_). Пектинлиазоподобные последовательности и бета-спирали типичны для фаговых деполимераз, описанных в других исследованиях [3, 6, 7, 8, 9], что согласуется с наличием ореолов, окружающих негативные колонии vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV (рис. 1).

Выравнивание аминокислотных последовательностей деполимераз vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV по BLASTp показало, что белки идентичны друг другу на 29,73% при охвате 99%. Существенные отличия друг от друга Gp28 и Gp31, дают основания ожидать, что эти два фермента будут значительно различаться по своим ключевым характеристикам, таким как сродство к бактериальному гликокаликсу, специфичности к субстратам и т.д.

Гомологи этих белков, по данным BLASTP, обнаружены только внутри рода *Andromedavirus*, и, как нам известно, не были изучены. Мы полагаем, что деполимеразы vB_BpS_NMSK и vB_BpS_BLKV могут иметь высокий потенциал для борьбы со штаммами – контаминантами, формирующими биоплёнки.

## Литература


1. *Fu Y, Liang L, Deng S, Wu Y, Yuan Y, Gao M.* Novel spore lytic enzyme from a Bacillus phage leading to spore killing. Enzyme and Microbial Technology. 2020 Dec 1;142:109698. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109698.
2. Council of Europe (Author). European Pharmacopoeia 5th Ed. Main Volume 5.0, 2005 with Supplements 5.1 and 5.2 5th Revised edition. (July 1, 2004) ISBN-13: 978-9287152817 ISBN-10: 9287152810
3. *Oliveira H., Costa A.R., Konstantinides N., Ferreira A., Akturk E., Sillankorva S., Nemec A., Shneider M., Dötsch A., Azeredo J.* Ability of phages to infect Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains. Environmental microbiology. 2017 Dec;19(12):5060-77. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13970.
4. *Domingo-Calap P., Beamud B., Mora-Quilis L., González-Candelas F., Sanjuán R.* Isolation and characterization of two Klebsiella pneumoniae phages encoding divergent depolymerases. International journal of molecular sciences. 2020 Jan;21(9):3160. https://doi.org/10.3390/ijms21093160
5. *Oliveira H., Pinto G., Mendes B., Dias O., Hendrix H., Akturk E., Noben J.P., Gawor J., Łobocka M., Lavigne R., Azeredo J.* A tailspike with exopolysaccharide depolymerase activity from a new Providencia stuartii phage makes multidrug-resistant bacteria susceptible to serum-mediated killing. Applied and Environmental Microbiology. 2020 Jun 17;86(13):e00073-20. https://doi.org/10.1128/aem.00073-20.
6. *Jenkins J., Mayans O., Pickersgill R.* Structure and evolution of parallel β-helix proteins. Journal of structural biology. 1998 Jan 1;122(1-2):236-46. https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3985.
7. *Mitraki A., Miller S., van Raaij M.J.* Conformation and folding of novel beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple beta-spiral and triple beta-helix. Journal of structural biology. 2002 Jan 1;137(1-2):236-47. https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4447.
8. *Pires D.P., Oliveira H., Melo L.D., Sillankorva S., Azeredo J.* Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. Applied microbiology and biotechnology. 2016 Mar 1;100(5):2141-51. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0.
9. *Latka A., Maciejewska B., Majkowska-Skrobek G., Briers Y., Drulis-Kawa Z.* Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. Applied microbiology and biotechnology. 2017;101(8):3103. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8224-6.

# Оптимизация технологии получения препарата бактерий человека для биологической коррекции микрофлоры кишечника

*Сорокина Е.А.[1*], Жгун Е.С.[2], Кислун Ю.В.[2], Денисова Е.А.[2], Беспятых Ю.А.[2], Ильина Е.Н.[2]*

[1] Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Москва
[2] Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва
sorokina1901@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38042

К настоящему моменту эффективность трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) в лечении различных патологий ЖКТ не вызывает сомнений. Препараты фекалий доставляют как через нижние отделы ЖКТ (клизма, колоноскопия), так и верхние (эндоскопия, капсулы). Общим недостатком инструментальных методов введения является их высокая инвазивность, связанная с риском перфорации кишечника и применением анестезии. Пероральные капсулы минимально инвазивны, удобны и более эстетичны, поэтому пациенты отдают предпочтение этому способу доставки препарата.

Основной вопрос, связанный с использованием замороженного кала (в том числе лиофилизата, используемого в капсулах) это его эффективность по сравнению с исходным материалом. В процессе лиофилизации клетки подвергаются действию стрессовых факторов, таких как низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация. Чтобы снизить вероятность клеточных поврежденный при лиофилизации используют защитные среды.

Целью работы явилась оптимизация условий лиофилизации биоматериала для фекальной трансплантации, оценка «выживаемости» микроорганизмов и сопоставление молярных соотношений короткоцепочечных жирных кислот в полученных лиофилизатах по сравнению с исходными образцами кала. В качестве лиопротекторов в работе использовали сахарозу, желатин и их комбинации. (сахароза 5,10,20%, сахароза 5,10% + желатин 1%). Для оценки количества микроорганизмов проводили бактериологическое исследование. Оценивали количество бифидобактерий, лактобактерий, и общее число эшерихий и энтеробактерий как наиболее значимых представителей нормальной микрофлоры кишечника (табл. 1).

Материалом для исследования служили фекалии донора-волонтера, полученные после естественной дефекации. Донор-волонтер отвечал критериям отбора для включения в проект «Создание биобанка фекальных образцов здоровых доноров ФНКЦ ФХМ», одобренный Локальной этической комиссией ФНКЦ ФХМ от 06.09.2016. От всех доноров-волонтеров было получено информированное добровольное согласие.

*Таблица 1*

| Вид микроорганизмов | Количество микроорганизмов в 1 г фекалий | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Исходный материал | Полученные лиофилизаты | | |
| | | 5% | 10% | 20% |
| *Bifidobacterium* | $10^8$ | $10^8$ | $10^8$ | $10^8$ |
| *Lactobacillus* | $10^7$ | $10^7$ | $10^7$ | $10^7$ |
| *Enterobacterales* | $10^8$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^4$ |
| *E. coli* | $10^8$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^4$ |
| *Enterococcus* | $10^6$ | $10^4$ | $10^4$ | $10^4$ |

Лиофилизацию фекалий проводили следующим образом. Свежий образец фекалий донора (40 г.) разбавляли фосфатным буфером (0,1 М, pH 7,4) до финального объемного соотношения фекалии: буфер 1:4. Для получения гомогенной массы использовали бытовой блендер. Полученную суспензию фильтровали через ситечко для чая (диаметр отверстий 1–2 мм) и разливали в стерильные емкости для замораживания (объемом 50 мл). В зависимости от выбранной процентной концентрации сахарозы (5%,

10%, 20%) и финального объема смеси (40 мл) в емкости добавляли рассчитанное количество сахарозы (“Sigma-Aldrich”, США) (2, 4, 8 г. соответственно). Объем смеси доводили до 40 мл фосфатным буфером. Каждый приготовленный образец (40 мл) разливали в 2 стеклянных стакана для лиофилизации и замораживали при −80 ° С. После заморозки помещали в лиофильную сушилку на 48 час при температуре -23 °С, давление 0,01–0,03 атм.

Предварительно перед бактериологическим исследованием оценивали структуру полученных лиофилизатов с точки зрения их практической пригодности для ручного наполнения капсул. Из полученных данных следует, что с у образцов с содержанием сахарозы в концентрациях 5 и 10% структура была воздушная, хорошо поддающаяся дроблению в высокодисперсные частицы, напоминающие «кофейный порошок». Структура не менялась с течением времени и была удобна для технологического применения. Лиофилизаты, содержащие смесь лиопротекторов сахароза-желатин оказались непригодны для дальнейшего практического использования из-за их частичного вспенивания с образованием пористой структуры и сложностью дробления полученного материала в однородный порошок. Следует отметить, что бактериологическое исследование не выявило количественных различий при добавлении желатина. В лиофилизированных образцах кала, содержащих в качестве защитной среды 5% и 10% сахарозу наблюдали наибольшее количество жизнеспособных клеток.

Образец с содержанием сахарозы 20% так же оказался непригоден, так как сложно измельчался, не обладал сыпучестью, был гигроскопичен, и показал худший результат бактериологического исследования.

Методом газовой хроматографии были исследованы молярные соотношения КЖК в исходных образцах кала и лиофилизатах. Молярные соотношения мажорных КЖК (ацетата, пропионата и бутирата) оказались идентичны в исследуемых образцах.

Для дальнейшей отработки методики и последующего технологического использования, было решено использовать лиофилизат с содержанием сахарозы 10%, так как такая концентрация лиопротектора, по данным литературы, более традиционна для лиофилизации бактерий [1]. Воспроизводимость результатов («выживаемость» бактерий в лиофилизированных образцах кала) оценивали на основании 6 повторных серий экспериментов. Коэффициент линейной корреляции Пирсона между сериями составил r = 0.8

### Литература

1. Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. Retrieved November 26, 2020 from: http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html.

## Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на экспозицию бактерий *Escherichia coli* к ципрофлоксацину

*Сутормина Л.В.[1], Калашникова Т. В.[2], Смирнова Г.В.[2], Октябрьский О.Н.[2]*

[1] ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38043

В последние время особенно актуальна проблема увеличения числа антибиотикорезистентных форм патогенных микроорганизмов и, как следствие, снижения эффекта от лечения противомикробными препаратами [1]. Массовое применение антибиотиков в животноводстве создаёт благоприятные условия для образования новых штаммов патогенных бактерий и формирования у них антибиотикорезистентности [2, 3]. Возникшая проблема делает актуальным изучение новых путей получения противомикробных препаратов. Перспективным считается разработка и применение препаратов, позволяющих усиливать антимикробный эффект антибиотиков, но нейтрально или даже положительным образом влияющих на

нормальную микрофлору кишечника. Накопленные данные свидетельствуют о том, что экстракты некоторых растений, содержащие полифенолы и обладающие за счет этого антиоксидантной активностью, способны модифицировать антимикробный эффект антибиотиков [4]. Одним из растительных источников полифенолов является левзея сафлоровидная – многолетнее травянистое растение рода Рапотникум, семейства Астровых. Левзея широко применяется как кормовое растение в животноводстве, а также используется в народной медицине и является компонентом некоторых фармпрепаратов. Целью данной работы было изучение влияния экстракта левзеи на бактерии *Escherichia coli* при действии антибиотика ципрофлоксацина, применяемого в животноводстве.

Водно-спиртовой экстракт левзеи сафлоровидной, используемый в данной работе, был получен из надземной части растений, собранных в фазе бутонизации и начала цветения на опытном участке Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства ПФИЦ УрО РАН. Ранее было выявлено, что изучаемый экстракт содержал значительное количество фенольных соединений, а также проявлял радикалсвязывающую и хелатирующую активности [5]. Воздействие антибиотиков исследовали с использованием бактерий *Escherichia coli,* которые являются типичными представителя микробиоты кишечника. Изучалось действие фторхинолона ципрофлоксацина, который подавляет синтез ДНК бактерий.

Ночную культуру *E. coli* BW25113, выращивали в термостате при 37 ºС (37 ºС) на минимальной среде М9 с глюкозой (4 г/л). Ципрофлоксацин в концентрациях 0,3 и 3 мкг/мл добавляли при достижении культурой оптической плотности $OD_{600}$ = 0.4. Экстракт в концентрации 100 мкг/мл вносили в культуру за 30 минут до добавления антибиотика. В качестве растворителя для экстракта использовали диметилсульфоксид (ДМСО).

Исследуемый экстракт и ДМСО в отсутствие антибиотика не оказывали значительного влияния на удельную скорость роста бактерий (рис. 1А). Добавление ципрофлоксацина (0,3 и 3 мг/мл) ингибировало рост *E. coli*, что выражалось в падении удельной скорости роста (μ). Через 60 минут после добавления 3 мкг/мл ципрофлоксацина скорость роста снижалась до отрицательных значений, что свидетельствует о гибели части клеток в популяции. При более низкой концентрации антибиотика ингибирование скорости роста было выражено в меньшей степени (рис. 1В). Предобработка бактерий экстрактом за 30 минут до добавления низкой дозы ципрофлоксацина замедляла падение скорости роста, в то время как в случае высокой дозы экстракт не оказывал эффекта.

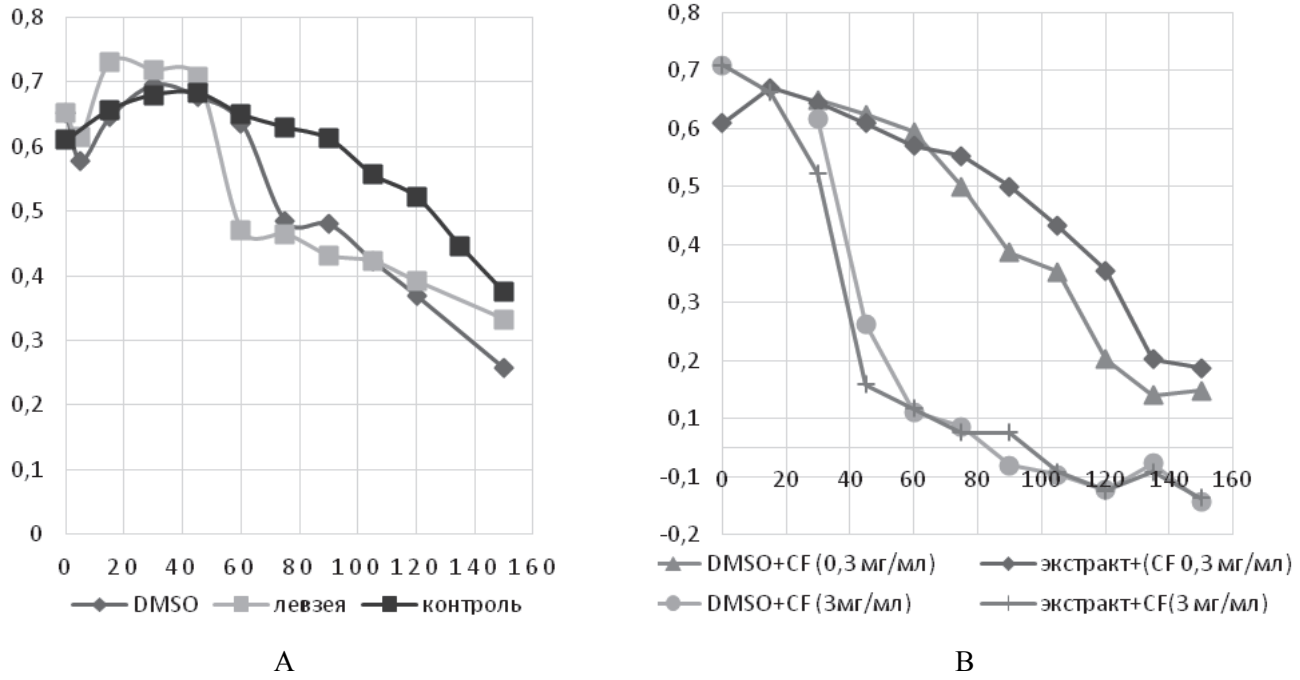



**Рис. 1.** Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на ростовые характеристики бактерий E. coli BW25113 при действии ципрофлоксацина: А – влияние ДМСО и экстракта (100 мкг/мл) на удельную скорость роста E. coli; В – влияние предобработки экстрактом левзеи при действии ципрофлоксацина в концентрации 0,3 и 3 мкг/мл

Анализ колониеобразующей способности показал, что обе дозы ципрофлоксацина производят сильный бактерицидный эффект, снижая КОЕ на 4 порядка по сравнению с контролем (рис. 2).

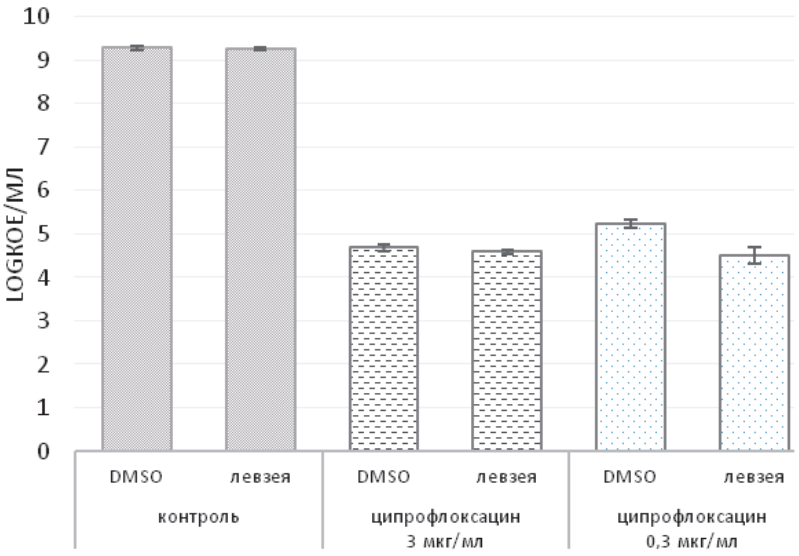



**Рис. 2.** Влияние предобработки экстрактом левзеи на КОЕ при coli при действии антибиотика

Предобработка экстрактом левзеи несколько усиливала бактерицидный эффект ципрофлоксацина при дозе антибиотика 0,3 мкг/мл, но не влияла на количество КОЕ при дозе 3 мкг/мл. Таким образом, результаты исследования показали, что предобработка экстрактом левзеи сафлоровидной не оказывает значительного модифицирующего влияния на действие ципрофлоксацина. Слабый потенцирующий эффект экстракта на летальность низкой дозы ципрофлоксацина может быть связан с более длительным сохранением метаболической активности бактерий (более высокой удельной скорости роста) в присутствии экстракта при этой дозе антибиотика, что повышает количество активных мишеней для антибиотика. Антимикробная активность самого экстракта не выявлена.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Урал 19-44-590009.*

## Литература

1. *Габидова А. Э. Галынкин В.А*. Основные начала возникновения резистентности в биосфере // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. – № 3, С. 92–102.
2. *Тутник А.Н.* Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах животноводства и растениеводства // Ветеринария, 2007. №10. С. 48–52.
3. *Сухих С.А. Башкирцева Н.А., Крумликов В.Ю., Дышлюк Л.С.* Изучение антибиотической резистентности штаммов микроорганизмов, выделенных из национальных казахских кисломолочных напитков / Научные исследования и разработки молодых ученых. 2016. № 12. С. 18–22.
4. *Oktyabrsky O., Vysochina G., Muzyka N., Samoilova Z., Kukushkina T., Smirnova G.* Assessment of antioxidant activity of plant extracts using microbial test systems // J. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 106. – P. 1175–1183.
5. *Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Самойлова З.Ю., Ушаков В.Ю., Музыка Н.Г., Октябрьский О.Н.* Оценка антиоксидантных свойств экстракта кормовых растений с использованием микробных тест-систем // XII Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2020», Пермь, с. 48–50.

# Генерация электроэнергии при очистке бытовых сточных вод микробным топливным элементом

*Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Решетилов А.Н.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), setar25@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38044

При разработке микробных топливных элементов (МТЭ) большое внимание уделяется вопросам долговременной активности биологического материала. Одним из наиболее распространенных способов иммобилизации клеток на поверхности анода МТЭ является их захват в различные гели. При этом большинство используемых гелей не электропроводны, поэтому необходима их модификация дополнительными проводящими частицами. Одним из перспективных проводящих полимеров является ПЭДОТ:ПСС ((поли(3,4-этилендиокситиофен): полистеренсульфоновая кислота). Зачастую ПЭДОТ:ПСС дополнительно модифицируют углеродными наноматериалами для повышения его электрической проводимости и увеличения площади поверхности [1].

Целью настоящей работы являлось создание эффективного композита, используемого при иммобилизации клеток на поверхности анода МТЭ для долговременной генерации электроэнергии от бытовых сточных вод.

Для создания МТЭ применили уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*. В качестве основы иммобилизующей матрицы использовали коммерчески доступный препарат графен/ ПЭДОТ:ПСС и гель Нафион.

На каждом этапе формирования анода его электрохимические характеристики исследовали с помощью методов электрохимического анализа – циклическая вольтамперометрия и импедансная спектроскопия. Было показано, что применение графена позволяет снизить сопротивление переноса заряда по сравнению с вариантом без графена. Это может быть связано с π–π взаимодействием между ПЭДОТ и графеном, которое позволяет понизить общее сопротивление системы [2]. При этом добавление Нафиона значительно повышает общее сопротивление системы, т.к. сам по себе Нафион не является хорошим проводником [3]. Дальнейшее добавление бактериальных клеток в систему приводит к снижению сопротивления переноса заряда, которое дополнительно понижается в присутствии субстратов (использовали глюкозу). Снижение импеданса при добавлении глюкозы показывает наличие процессов переноса электронов в результате трансформации глюкозы клетками.

Исследовали количество и соотношение биокатализатора и Нафиона на поверхности биоанода, влияние pH и концентрации соли на сигналы электрода, оценивая жизнеспособность бактериальных клеток в каждом варианте в течение двух недель. Был выбран оптимальный вариант композиции для дальнейшего использования.

Биоэлектрод с подобранными параметрами продемонстрировал высокую стабильность при хранении при температуре 4 °C между измерениями в течение 4 месяцев. Общий уровень сигнала биосенсора оставался на одном уровне в течение 120 суток. К 140-м суткам снижение уровня сигнала составило около 37%, к 160-м суткам электрод сохранил 27% своей активности. Таким образом повышенная кислотность Нафиона не оказывала негативного эффекта на жизнедеятельность бактерий *G. oxydans*. Показано, что применение ПЭДОТ:ПСС снижало сродство и кооперативность клеточных ферментов к субстрату, а введение графена нивелировало отрицательное действие ПЭДОТ:ПСС на бактериальные клетки.

Была изучена возможность практического применения разработанного МТЭ для очистки бытовых сточных вод. Для накопления электроэнергии использовали конвертерную установку на основе микросхемы bq25504 (Texas Instruments, США) и конденсаторы различной емкости, время заряда которых отражало скорость процесса накопления электрической энергии от МТЭ. Показана возможность заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ при использовании образцов бытовых сточных вод из очистных сооружений г. Пущино в качестве анолита МТЭ. С помощью микробного биосенсора на основе кислородного электрода типа Кларка контролировали уровень содержания легкоокисляемых органических

соединений в образцах сточных вод до подачи в МТЭ и в образцах, отобранных из анодного отделения МТЭ через сутки работы. На рисунке 1 представлена генерация электроэнергии макетом МТЭ без дополнительного внесения субстратов.

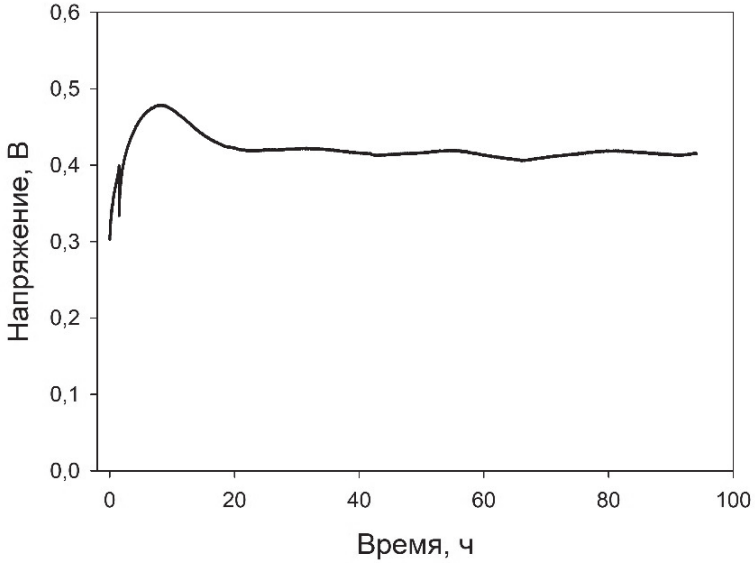



**Рис. 1.** Долговременная генерация электроэнергии двумя последовательно соединенными МТЭ при окислении органических субстратов, содержащихся в реальных образцах сточных вод. В анодном отделении в качестве медиатора использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол, в катодном – гексацианоферрат калия (III)

Максимальный уровень напряжения, генерируемый двумя МТЭ при работе от сточных вод, составил 480 мВ. Время заряда конденсатора емкостью 6800 мкФ при генерации электроэнергии от образцов сточных вод составило 32 минуты.

Таким образом, разработанная композиция для иммобилизации бактериальных клеток на аноде МТЭ позволила создать долговременно работающий макет МТЭ для одновременной эффективной очистки сточных вод и генерации электроэнергии.

## Литература


1. *Kaur G.; Kaur A.; Kaur H.* Review on nanomaterials/conducting polymer based nanocomposites for the development of biosensors and electrochemical sensors. Polym. Plast. Tech. Mat. 2020, 60, 502–519
2. *Liu D.; Rahman M.M.; Ge C.; Kim J.; Lee J.-J.* Highly stable and conductive PEDOT:PSS/graphene nanocomposites for biosensor applications in aqueous medium. New J. Chem. 2017, 41, 15458–15465.
2. *Alanazi T.* The Study of the Dielectric Properties of Nafion-117 Thin Film. Master's Thesis, University of Akron, Akron, OH, USA, 2016.


# Родококки как перспективные биодеструкторы фармполлютантов


*Тюмина Е.А.[1,2], Бажутин Г.А.[1,2], Полыгалов М.А.[1,2], Субботина М.В.[2], Тян С.М.[2], Ившина И.Б.[1,2]*

[1] Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
(Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН), Пермь
[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, tyumina@psu.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38045


Фармацевтически активные соединения входят в перечень недавно признанной группы эмерджентных загрязнителей, повсеместно детектируемых в водных и наземных экосистемах [1–3]. Основные источники поступления фармвеществ в окружающую среду − муниципальные и промышленные сточные

воды, стоки с животноводческих ферм, сельскохозяйственных полей и предприятий аквакультуры, неэффективная утилизация фармацевтических отходов, нерациональное потребление медикаментов населением. Несмотря на относительно низкие уровни (от нескольких нг/л до сотен мкг/л) присутствия в среде, фармсоединения оказывают выраженные негативные эффекты на живые организмы, способствуют распространению антибиотикорезистентности, а также участвуют в дестабилизации экосистем [3, 4]. В связи с этим актуальна разработка эффективных технологий нейтрализации и детоксикации фармполлютантов.

На фоне острых социально-экономических и экологических проблем (изменение климата, катастрофическое сокращение биоразнообразия, чрезмерная эксплуатация природных ресурсов, нехватка продовольствия и чистой питьевой воды, возрастающее загрязнение окружающей среды) очевидным является переход к биоэкономике – экономике, основанной на использовании возобновляемого биологического сырья [5, 6]. Активно внедряются инновационные ферментативные и цельноклеточные микробные системы для очистки сточных вод и биоремедиации антропогенно загрязненных территорий. Одной из биотехнологически значимых групп микроорганизмов, способных к окислению и полной деградации широкого спектра органических соединений, являются актиномицеты рода *Rhodococcus* (класс *Actinomycetia*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*) [7]. Катаболическая гибкость, уникальные ферментативные возможности, широкая субстратная ориентированность, характерный комплекс стратегий выживания определяют повсеместное распространение и доминирующую роль родококков в процессах естественного очищения техногенно нарушенных экосистем [8−10].

На примере нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), наиболее часто детектируемых в окружающей среде, изучена кинетика и механизмы процессов метаболизации этих фармацевтических загрязнителей с использованием родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, www.iegmcol.ru, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, имеет статус Центра коллективного пользования, http://www.ckp-rf.ru/ckp/480868/). С помощью системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования выявлены изменения морфометрических параметров и физико-химических свойств клеточной поверхности родококков при раздельном и совместном воздействии фармполлютантов (диклофенака, ибупрофена, напроксена, кетопрофена, мелоксикама, в частности); методом высокоточной респирометрии исследована физиология ключевых биоокислителей; в результате проведенного биоинформатического анализа геномов *R. erythropolis* ИЭГМ 767, *R. ruber* ИЭГМ 231 изучены функциональные гены биодеградации экотоксикантов, а также роль антиоксидантных ферментов в адаптации родококков к фармполлютантному стрессу; расшифрованы пути биодеструкции фармполлютантов и обнаружены новые метаболиты с выраженной биоактивностью; получена серия работающих прототипов биокатализаторов с высокой функциональной стабильностью при многократном (до 5 последовательных циклов) использовании и хранении в течение 6 и более месяцев. Разработанные биокатализаторы перспективны для использования в процессах доочистки сточных вод предприятий фармацевтического профиля, а также для утилизации опасных фармацевтических отходов.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00132, https://rscf.ru/project/21-14-00132/.*

## Литература

1. *aus der Beek T. et al.* Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // Environ. Toxicol. Chem. 2016. Vol. 35, N. 4. P. 823–835.
2. *Khan H.K., Rehman M.Y.A., Malik R.N.* Fate and toxicity of pharmaceuticals in water environment: An insight on their occurrence in South Asia // J. Environ. Manage. 2020. Vol. 271. P. 111030.
3. *Dai C. et al.* Human health risk assessment of selected pharmaceuticals in the five major river basins, China // Sci. Total Environ. Elsevier, 2021. Vol. 801. P. 149730.
4. *Richmond E.K. et al.* A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, N. 1. P. 4491.
5. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S.* Specialized microbial resource centers: A driving force of the growing bioeconomy // Microbial Resource Conservation, Soil Biology / eds. Sharma S.K., Varma A. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2018. P. 111−140.

6. *Marvik O.J., Philp J.* The systemic challenge of the bioeconomy // EMBO Rep. 2020. Vol. 21, N. 10. P. e51478.
7. *Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I.* Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // Catalysts. 2019. Vol. 9. P. 236.
8. *Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R.* Genomes and plasmids in *Rhodococcus* // Biology of *Rhodococcus* / ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 73–90.
9. *Cappelletti M. et al.* Genomics of *Rhodococcus* // Biology of *Rhodococcus* / ed. Alvarez H.M. Cham: Springer, 2019. P. 23–60.
10. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B.* Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* // Biology of *Rhodococcus* / ed. Alvarez H.M. Cham: Springer, 2019. P. 231–270.

# Биоэлектрокаталитические свойства метилобактерий *M. extorquens* pCM160 в присутствии медиаторов электронного транспорта – феназинметасульфата и 2,6-дихлорфенолиндофенола

*Улитина М.А.*

Тульский государственный университет, ulitina.maria98@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38046

В настоящее время амперометрические биосенсоры являются наиболее распространенными приборами биомолекулярной электроники. В качестве биокатализаторов могут выступать бактериальные клетки, их клеточные структуры и выделенные ферменты [1]. Сейчас известно немного работ, описывающих работу амперометрических биосенсоров на основе метилобактерий с использованием растворимых медиаторов. Именно поэтому изучение биоэлектрокаталитических свойств метилобактерий *Methylorubrum extorquens* pCM160 в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и феназинметасульфата (ФМС) является актуальной задачей.

Целью работы является изучение биоэлектрокаталитических свойств метилобактерий *M. extorquens* pCM160 в присутствии искусственных акцепторов электронов – ФМС и ДХФИФ.

Микроорганизмы выращивали на минеральной среде Канеда с добавлением метанола (0,5%/об) и канамицина (0,05 г/л) как описано ранее. Биомассу микроорганизмов отделяли центрифугированием на 5 сутки культивирования, дважды промывали 50 мМ калий фосфатным буфером и хранили в морозильной камере при температуре -20 °С.

В качестве биоматериала для рабочего графито-пастового электрода использовали микроорганизмы *M.extorquens* pCM160.

Электрохимические измерения проводили при помощи гальванопотенциостата «IPC-Micro», интегрированного с ПК, по установленной методике.

Рабочий и хлорсеребряный электроды погружали в электролитическую ячейку, содержащую раствор фосфатного буфера с pH = 8,0 и медиаторы электронного транспорта– ФМС (1М) и ДХФИФ (0,08 М). Измерения выполняли при постоянном потенциале 250 мВ и непрерывном перемешивании (300 об/мин). В качестве исследуемого раствора использовали метанол.

Процесс, протекающий при окислении метанола мембранной МДГ, содержащей кофактор PQQ, в присутствии ФМС и ДХФИФ, может быть представлен следующим образом:

Анод: $CH_3OH + PQQ\text{-МДГ} \rightarrow HCOH + PQQH_2\text{-МДГ}$

$PQQH_2\text{-МДГ} + ФМС_{ок.} \rightarrow ФМС_{вос.} + PQQ\text{-МДГ}$

$ФМС_{вос.} + ДХФИФ_{ок.} \rightarrow ФМС_{ок.} + ДХФИФ_{вос.}$

Катод: $AgCl + e^- \rightarrow Ag + Cl^-$

Так как ДХФИФ может восстанавливаться флавопротеиновыми ферментами и, с помощью ФМС, в качестве промежуточного переносчика электрона, соединиться с никотинамиднуклеотидсвязанными дегидрогеназами, тем самым обуславливается работа данной медиаторной пары.

Полученные экспериментально зависимости генерируемого тока от концентрации метанола в кювете в присутствии растворимых медиаторов ФМС и ДХФИФ были аппроксимированы к уравнению Хилла. Константа Михаэлиса составила 0,8±0,2 мМ, а максимальная скорость 14000±800 нА.

Для снижения ошибок анализа использовали линейный участок калибровочных зависимостей y = (7400±600)x + (2000±200), R = 0,9609.

Для количественной оценки операционной стабильности сенсора использовали относительное стандартное отклонение $S_r$ (ответы сенсора на модельный раствор 12,8 мМ метанола в кювете), которое составило 6%. Среднее значение ответов биосенсора – 8300±300 нА.

Для определения долговременной стабильности проводили измерения, используя раствор метанола с одинаковой концентрацией (12,8 мМ) в течение нескольких суток. Между периодами измерений рабочий электрод хранили в буферном растворе (фосфатный буфер, pH = 8,0) при температуре +4°.

На протяжении всего эксперимента зарегистрированы как низкие ответ сенсора, так и высокие, смеющие друг друга, тем самым наблюдалась стабильная долговременная зависимость со сроком 88 дней. Таким образом, данный биосенсор может использоваться в анализах с длительностью в несколько месяцев, не снижая свою эффективность и обеспечивая правильность и истинность эксперимента.

Аналитические и метрологические характеристики амперометрического медиаторного биосенсора на основе метилобактерий *M. extorquens* pCM160 в присутствии растворимой медиаторной пары ФМС и ДХФИФ приведены в таблице. Данные сравнивали с ранее полученными для подобной системы в присутствии медиатора ферроцена.

*Таблица*

**Аналитические и метрологические характеристики сенсора на основе метилобактерий *M. extorquens* pCM160**

| Характеристика биосенсора | ДХФИФ и ФМС | Ферроцен (Кузнецова, 2017) |
|---|---|---|
| Коэффициент чувствительности, нА×дм$^3$/мМ | 7400±600 | 1600±500 |
| Предел обнаружения, мМ | 0,05 | 0,023 |
| Нижняя граница определяемых концентраций, мМ | 0,2±0,1 | 0,06±0,01 |
| Повторяемость, отклонение от среднего значения за 15 измерений, % | 6 | 13 |
| Долговременная стабильность, сут | 88 | 3 |
| Верхняя граница линейного диапазона определяемых концентраций ($K_м$), мМ | 0,8±0,2 | 0,97±0,09 |

Таким образом, чувствительность данного биосенсора выше почти в 5 раз, а предел обнаружения (0,05 мМ) примерно равен пределу обнаружения в присутствии медиатора ферроцена.

Стабильность сенсора в присутствии ФМС и ДХФИФ выше, чем с использованием ферроцена в качестве медиатора, что обуславливается низким значением относительного стандартного отклонения ($S_r$ = 6%), являющегося количественной характеристикой сходимости (повторяемости).

## Литература

1. *Троценко Ю.А.* Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2012. Т. 5. № 3. С. 243–279.

# Холестериноксидаза актинобактерий Nocardioides simplex

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

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН),
fokina@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38047

Холестерин оксидаза (ХО) – один из ключевых ферментов в катаболизме холестерина, катализирующий его окисление до холест-4-ен-3-она с восстановлением $O_2$ до $H_2O_2$. ХО широко применяется для определения общего холестерина в сыворотке крови, растительных стеринов – в пищевых продуктах, а также в биотехнологии и биомедицинских исследованиях. Высокая практическая значимость ХО определяет актуальность поиска новых продуцентов ХО и изучения свойств синтезируемых ферментов.

Ранее геном штамма почвенных непатогенных актинобактерий *Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д был секвенирован и аннотирован, на основании транскриптомных исследований были выявлены гены, кодирующие ферменты катаболизма стеринов. Уровень экспрессии одного (*KR76_09550*) из пяти кандидатных генов, кодирующих ХО, увеличивался до 10-13 раз при индукции фитостерином и холестерином, соответственно. В настоящей работе изучали функциональные свойства секретируемой ХО штамма Ac-2033Д.

Актинобактерии *N. simplex* выращивали на пептонно-дрожжевой среде с глюкозой. Супернатант фильтровали через мембранный фильтр (0,2 мкм) и тестировали на активность в отношении 3β-спиртов: дегидроэпиандростерона (ДГА), холестерина (Х), фитостерина (Ф), прегненолона (П), 5α-Н-холестанола (5αНХ). Стероиды анализировали методом обращённо-фазовой ВЭЖХ (хроматограф Agilent Infinity 1200 system, колонка Symmetry C18 (250×4.6 мм, 5 мкм), предколонка Symmetry C18 (5 мкм, 3.9×20 мм) при 50 °С и скорости потока 1 мл/мин, детекция при 240 нм), а также $^1$Н ЯМР (спектрометр Bruker

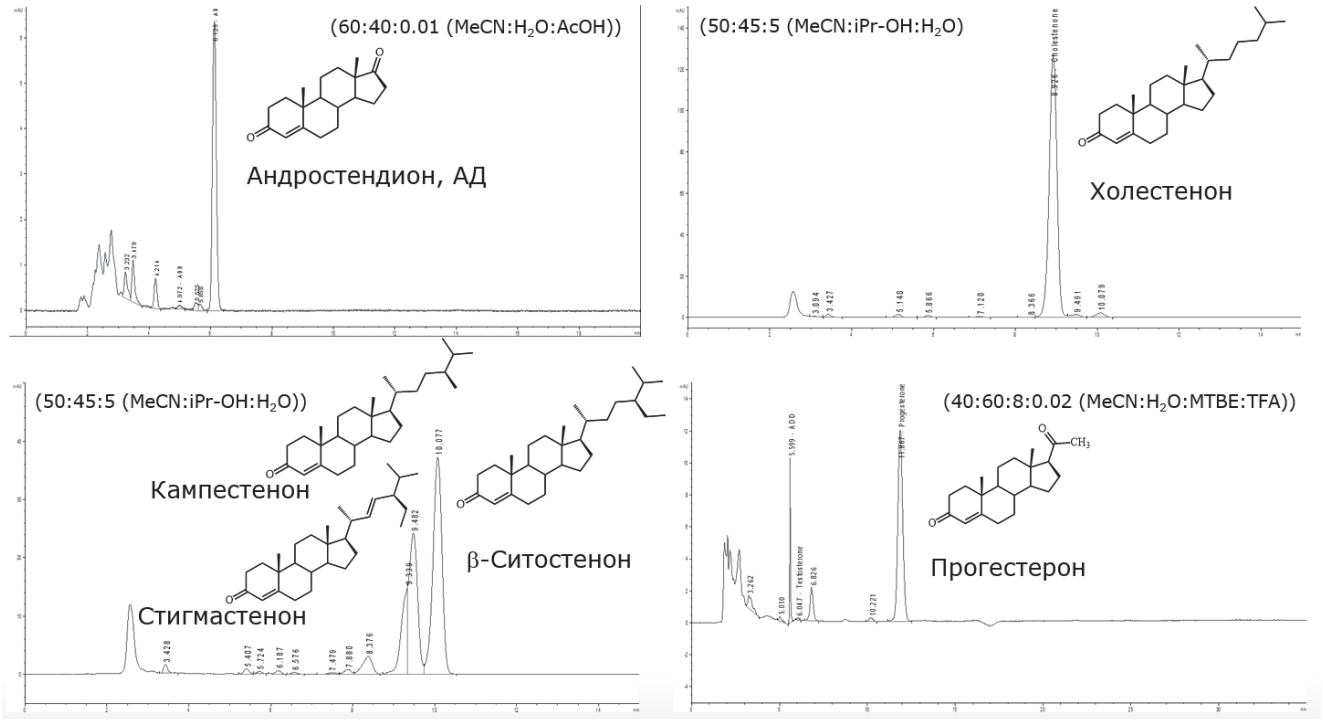



**Рис. 1.** ВЭЖХ-профили продуктов с 3-оксо-4-ен-структурой, образующихся при конверсии стероидных 3β-спиртов: ДГА, Х, Ф, П с участием ХО *N. simplex* Ac-2033Д

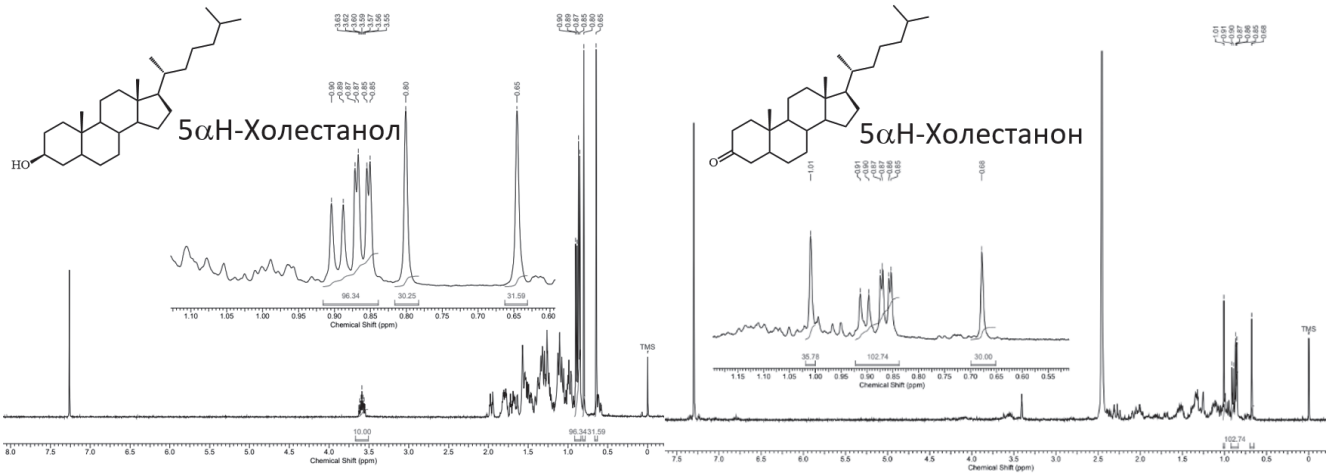



**Рис. 2.** Спектры $^{1}$H ЯМР 5αH-холестанола и 5αH-холестанона

Avance400, 400 МГц, растворитель $CDCl_3$). Сходство ХО (KR76_0955) *N. simplex* Ac-2033Д с другими микробными ХО проводили с использованием программного обеспечения BLAST.

Внеклеточная ХО *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д осуществляла биоконверсию Х, 5αНХ, Ф, П и ДГА с образованием холестенона, 5αH-холестанона, фитостенонов, прогестерона, андростендиона, соответственно (рис. 1, 2).

Максимальное сходство (62%) ХО KR76_0955 имеет с ChoE *Rhodococcus hoagii*, минимальное (15–23%) – с ХО микобактерий (*M. leprae* ChoD, *M. tuberculosis* H37Rv ChoD, *M. marinum* ChoD); сходство с ХО штаммов стрептомицетов не превышало 47–48% (рис. 3). Наиболее близкий гомолог ХО KR76_0955 – ChoE *R. hoagii* CAC44897.1, на 56% идентичный ХО представителей рода *Streptomyces*, содержит сигнальный пептид и является внеклеточным.

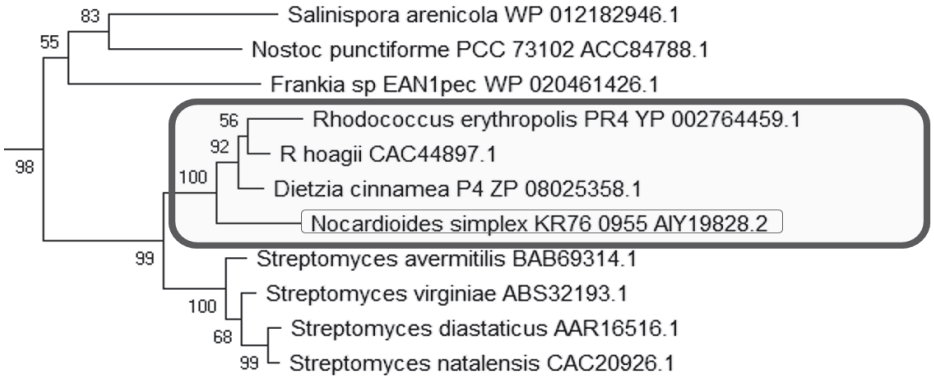



**Рис. 3.** Филогенетическая дендрограмма, иллюстрирующая положение ХО KR76_0955 актинобактерий N. simplex ВКМ Ac-2033Д относительно некоторых бактериальных ХО

Предпочтительными субстратами внеклеточной ХО штамма Ac-2033Д являются холестерин и 5αH-холестанол.

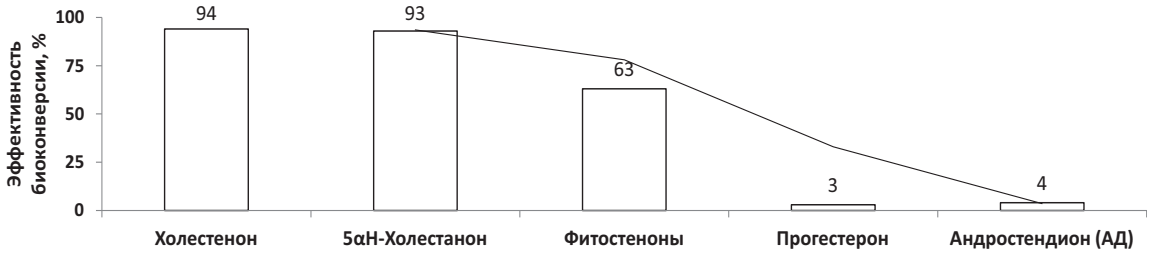



**Рис. 4.** Конверсия 3β-стероидных спиртов ХО N. simplex в 3-кето-продукты

Высокая функциональная активность секретируемой ХО *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д в отношении различных стеринов (рис. 4) определяют потенциал данного фермента для практического применения.

*Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-00024).*

## Анализ функции гена kstD2 из Nocardioides simplex ВКМ Ac-2033Д

*Фуфаева С.Р., Довбня Д.В., Ивашина Т.В., Шутов А.А., Донова М.В.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), sfufaeva@list.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38048

*Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д (ранее *Arthrobacter simplex*) –биотехнологически важный штамм, способный дегидрировать широкий спектр стероидных субстратов по положению С-1(2). Данную реакцию осуществляет ФАД-зависимый фермент 3-кетостероид 1(2)-дегидрогеназа (3КСД) (ЕС 1.3.99.4), относящийся к катаболическому пути окисления стеринов [1]. Ранее пять генов, предположительно кодирующих 3КСД, были идентифицированы в геноме штамма Ac-2033Д и разделены по трём различным ортогруппам (*kstD1*, *kstD2* и *kstD3*) [2]. Уровень экспрессии четырёх паралогов *kstD* увеличивается в присутствии стеринов, и только экспрессия единственного гена *kstD2* значительно возрастала в ответ на синтетический стероидный индуктор 21-ацетат кортизон (рис. 1).

Цель данной работы – охарактеризовать *in vivo* функцию фермента, кодируемого геном *kstD2* из *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д при его гетерологической экспрессии в клетках миколицибактерий.

Ген *kstD2* из *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д клонировали в экспрессионной плазмиде pMVT61 и вводили методом электропорации в клетки штамма *Mycolicibacterium neoaurum* NRRL B-3805Δ*kstD* [3] с инактивированным геном собственной 3КСД. Растущие или покоящиеся клетки полученного штамма *M. neoaurum* B-3805Δ*kstD*/pMVT61_*kstD2* использовали для биотрансформации стероидных субстратов – гидрокортизона, 6α-метил-гидрокортизона и фитостерина. В качестве контролей использовали родительский штамм или тот же штамм, несущий плазмиду pMVT61 без вставки.

Биотрансформация гидрокортизона рекомбинантным штаммом приводила к образованию 1-дегидрированных продуктов – преднизолона и его 20β-восстановленного аналога. В присутствии менадиона,

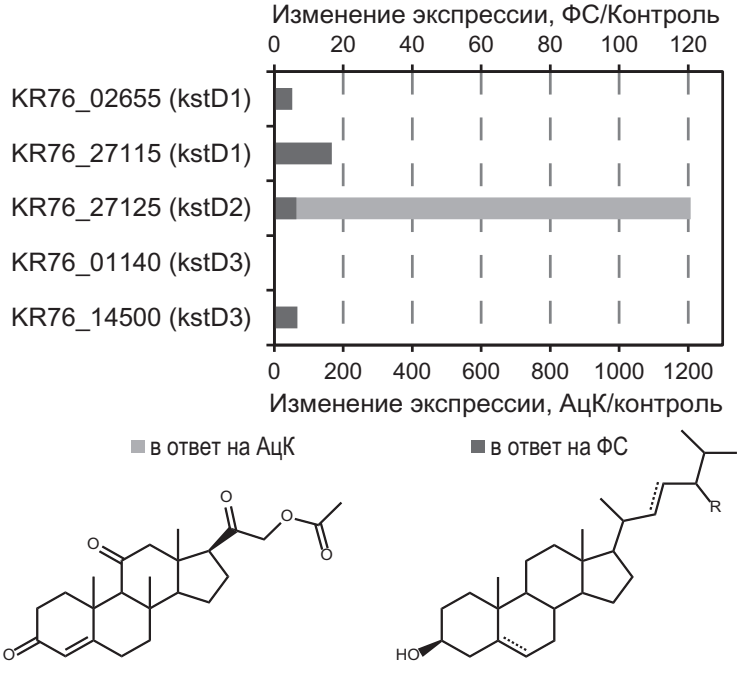



**Рис. 1.** Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих 3-КСД *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д [1] в присутствии стеринов или АцК по сравнению с контролем (без индуктора)

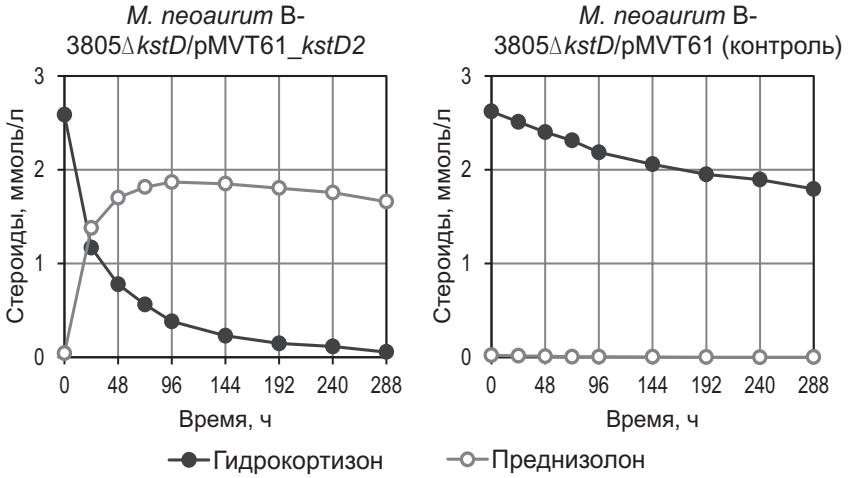



**Рис. 2.** Биотрансформация гидрокортизона в присутствии менадиона

ингибирующего реакции восстановительного характера, наблюдали полное превращение гидрокортизона (рис. 2). Рекомбинантный штамм также проявлял стероид-1-дегидрогеназную активность в отношении синтетического субстрата 6α-метил-гидрокортизона. В контрольных вариантах накопления 1-ненасыщенных стероидов не наблюдали.

При биотрансформации фитостерина рекомбинантный штамм продуцировал как характерные для родительского штамма 1-насыщенные стероидные катаболиты андрост-4-ен-3,17-дион (АД) и 20-гидроксиметил-прегн-4-ен-3-он (ГМП), так и соответствующие 1-дегидроаналоги (рис. 3).

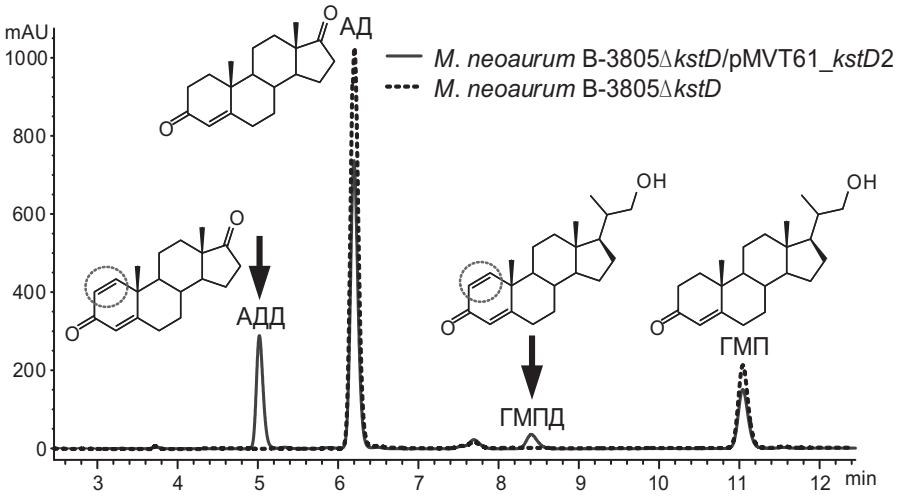



**Рис. 3.** ВЭЖХ-профили стероидов при биотрансформации фитостерина рекомбинантным и контрольным штаммами

Особенности организации клетки, наличие систем транспорта липофильных субстратов и отсутствие активности собственной 3КСД у *M. neoaurum* делает этот организм удобным объектом для экспрессии и сравнительного изучения различных 3КСД из *N. simplex* и других актинобактерий.

Таким образом, *in vivo* подтверждена функция гетерологически экспрессируемой 3-кетостероид-1-дегидрогеназы KstD2 из *N. simplex* в отношении ряда природных, синтетических стероидных субстратов и интермедиатов катаболизма стеринов (гидрокортизона, 6α-метил-гидрокортизона, АД, ГМП).

*Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 21-64-00024).*

## Литература

1. *Rohman A., Dijkstra B.W.* Application of microbial 3-ketosteroid $\Delta^1$-dehydrogenases in biotechnology/ Biotechnol Adv. – 2021. – № 49. – 107751.

2. *Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Bragin E.Y, Shutov A.A., Donova M.V.* Different genome-wide transcriptome responses of *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D to phytosterol and cortisone 21-acetate/ BMC Biotechnology. – 2021. – V. 21. – № 1. – P. 7.
3. *Loraine J.K., Smith M.C.M.* Genetic techniques for manipulation of the phytosterol biotransformation strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805/ Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology. – 2017. – V. 1645. – P. 93–108.

# Ростостимулирующие ризобактерии *Pseudomonas* sp.

*Хакимова Л.Р.* [1,2], *Минлишева Г.М.* [1], *Мурясова А.Р.* [1], *Вершинина З.Р.* [1,2], *Чубукова О.В.* [1,2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», г. Уфа
[2] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, lili-nigmatullina@bk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38049

Ризобактерии – большая группа бактерий, относящаяся к PGPR-микроорганизмам, которые тесно взаимодействуют с корнями растений и положительно влияют на их рост и развитие. Бактерии *Pseudomonas sp.* широко распространены в ризосфере растений и представляют собой большой интерес для сельского хозяйства ввиду развития биотехнологических способов повышения производства высококачественных экологически чистых продуктов за счет современных подходов в восстановлении плодородия почв, экологичных методов защиты урожая от болезней и вредителей, поиска продуцентов новых, более эффективных и безопасных антимикробных средств.

В нашей работе были исследованы 2 штамма бактерий *Pseudomonas sp.* 102 и 103. Был проведен анализ влияния данных ризобактерий на длину корней проростков растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) и рапса (*Brassica napus*). Для исследования влияния *Pseudomonas sp.* 102 и 103 на корневую систему растений, семена инокулировали тремя концентрациями бактерий: $10^3$ КОЕ/мл, $10^4$ КОЕ/мл и $10^5$ КОЕ/мл. Через неделю измеряли длину корней и сравнивали с длиной корней контрольных проростков (табл. 1).

*Таблица 1*

**Влияние концентраций бактерий на длину корней растений томата и рапса**

| Штамм | Концентрация, КОЕ/мл | Среднее значение длины корней томата, мм | Среднее значение длины корней рапса, мм |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas sp*. 102 | $10^3$ | 17±0,5 | 35±2,4 |
| | $10^4$ | 26±2,1 | 23±1,5 |
| | $10^5$ | 28±2,3 | 41±2,5 |
| *Pseudomonas sp*. 103 | $10^3$ | 20±1,6 | 50±2,3 |
| | $10^4$ | 36±2,6 | 77±3,1 |
| | $10^5$ | 35±1,1 | 85±2,8 |
| Контроль | - | 15±2,8 | 57±3,8 |

При обработке семян томата суспензиями *Pseudomonas sp*. 102 и *Pseudomonas sp*. 103 концентрациями $10^4$ КОЕ/мл и $10^5$ КОЕ/мл среднее значение длины корней превосходила контроль почти в 2 раза. В остальных вариантах инокуляции семян томата стимулирующего действия не наблюдалось.

На рост растений рапса обработка *Pseudomonas sp*. 102 не оказывала положительного влияния вне зависимости от концентрации бактерий. В случае растений, обработанных штаммом *Pseudomonas sp*.

103 в концентрациях $10^4$ КОЕ/мл и $10^5$ КОЕ/мл, длина корней опытных проростков превосходила контроль в 1,5 раза.

Полученные результаты показали, что *Pseudomonas sp*. 102 и *Pseudomonas sp*. 103 обладают ростостимулирующей активностью по отношению к растениям томата и рапса и могут быть использованы в качестве биоудобрений для стимуляции роста корней в концентрациях $10^4$ КОЕ/мл и $10^5$ КОЕ/мл.

*Работа была выполнена в рамках Программы создания и функционирования карбонового полигона на территории Республики Башкортостан «Евразийский карбоновый полигон» на 2021-2022 годы.*

## Сравнительный анализ различных методов выделения геномной ДНК на примере *Bacillus megaterium*

*Чернышов С.А., Цветкова Д.В., Микулинская Г.В.*

Филиал Института биоорганической химии РАН им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской Академии Наук (ФИБХ РАН), mikulinskaya@bibch.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38050

Бактерии рода *Bacillus* широко используются в биотехнологии как в качестве штаммов-продуцентов, так и в качестве источника новых генов. Выделение геномной ДНК бактерий – один из этапов их использования. Между тем, клеточная стенка грамположительных микроорганизмов имеет большую толщину (70–80 нм) и прочность, которая в значительной степени обусловлена наличием множества слоев пептидогликана – сложного природного полимера, содержащего нетипичные сахара, неканонические аминокислоты, D-аминокислоты и потому не подверженного гидролизу обычными пептидазами и обычными гликозилгидролазами. Анализ литературы показывает, что рекомендуемые в настоящее время методы выделения геномной ДНК из бактерий предполагают применение детергентов (додецилсульфата натрия SDS, бромида цетилтриметиламмония CTAB), хаотропных агентов (гуанидинтиоцианата GuSCN), неспецифических протеаз (протеиназы К), а также яичного лизоцима [1–4].

В нашей лаборатории проводятся исследования ферментов, специфически гидролизующих пептидогликан, источником их являются бактериофаги. Недавно нами было показано, что эндолизины колифагов RB43 и RB49 имеют широкий спектр действия и эффективно гидролизуют клеточные стенки бактерий рода *Bacillus* [5]. К преимуществам этих ферментов с точки зрения биотехнологического применения можно отнести стабильность, термоустойчивость и высокую удельную активность. Так, активность EndoRB49 на клетках различных бацилл в 6–15 раз выше, чем у лизоцима [5]. Мы предположили, что исследуемые ферменты могут умножить существующий биотехнологический инструментарий и послужить эффективной заменой неспецифическим гидролазам и химическим агентам при выделении бактериальной геномной ДНК.

Целью настоящей работы было провести сравнительный анализ 11 различных способов выделения геномной ДНК, используя в качестве критериев сравнения выход нуклеиновых кислот в целом и полимерной ДНК в частности, а в качестве модельной бактерии – *Bacillus megaterium*. Для сравнительного анализа были использованы следующие основные методы: физико-химический (SDS и СВЧ-излучение) [1], химический с GuSCN [2], химико-ферментативный с неспецифической протеазой (CTAB и протеиназа К) [3], а также четыре варианта специфического ферментативного гидролиза – с помощью лизоцима куриного яйца (HEWL) [4], EndoRB43, EndoRB49, а также коктейля EndoRB49/ HEWL – все это как в присутствии, так и в отсутствие детергента (SDS).

Для экспериментов брали 1,5 мл (20–24 мг сырой массы) ночной культуры клеток *Bacillus megaterium* и анализировали молекулярную массу, выход и чистоту препаратов ДНК, полученных разными методами. Во всех вариантах специфического гидролиза проводили 60-минутную обработку образцов с добавлением 20 мкг фермента (10+10 для коктейля). Депротеинизацию осуществляли по стандартному протоколу с помощью фенола и хлороформа. Полимерную ДНК после обработки РНКазой осаждали этанолом. Чистоту препаратов оценивали спектрофотометрически по соотношению поглощения $A_{260}/A_{280}$.

Все полученные образцы геномной ДНК были свободны от белков, имели размер >23 т.п.н., полностью гидролизовались рестриктазами EcoRI и HindIII, а также служили эффективной матрицей для ПЦР с вырожденными праймерами, специфичными к гену 16S РНК бацилл.

Однако, количество выделенной ДНК и общий выход нуклеиновых кислот варьировали очень сильно: явное преимущество по сравнению с физическими и химическими методами имели ферментативные методы, основанные на применении специфического гидролиза. На рис. 1 представлен результат электрофоретической оценки чистоты и количества ДНК, выделенной разными методами. Количественные измерения общей концентрации нуклеиновых кислот, а также концентрации полимерной ДНК, свободной от примесей рибонуклеотидов, представлены на рис. 2 в виде диаграмм. Максимальный выход ДНК составил 60 мкг на образец (2.7 мкг/мг сырой биомассы).

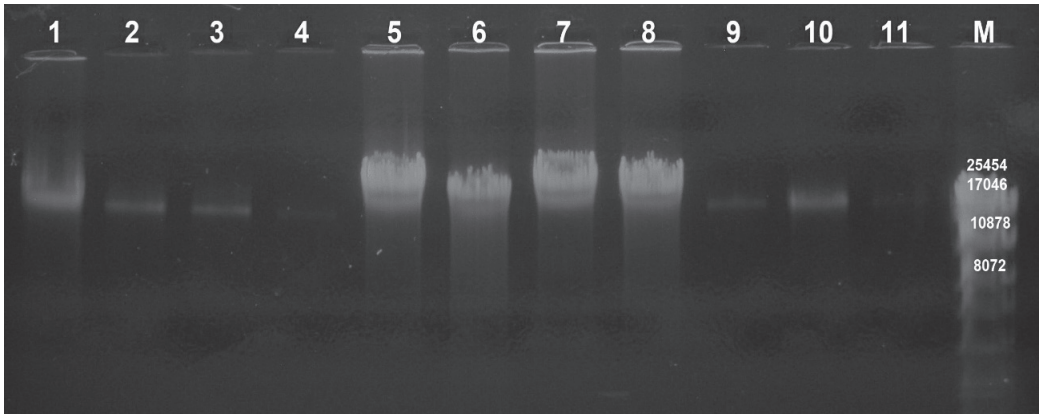



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ образцов геномной ДНК, выделенной из *Bacillus megaterium* с помощью: 1 – HEWL/SDS, 2 – HEWL, 3 – EndoRB43/SDS, 4 – EndoRB43, 5 – EndoRB49/SDS, 6 – EndoRB49, 7 – EndoRB49/HEWL/SDS, 8 – EndoRB49/HEWL, 9 – СВЧ-излучения, 10 – CTAB/протеиназы K, 11 – GuSCN. M – маркеры размера ДНК в п.н. ($T5^{+}$DNA/EcoRI/HindIII)

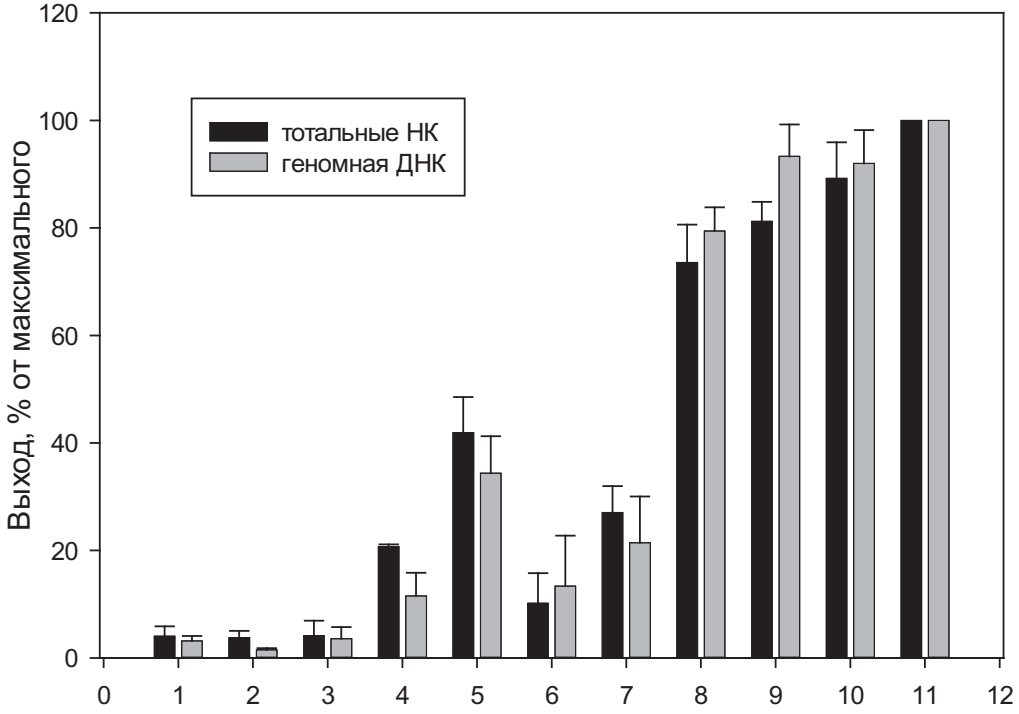



**Рис. 2.** Количественный анализ препаратов нуклеиновых кислот и геномной ДНК, полученных с помощью: 1 – СВЧ-излучения, 2 – CTAB/протеиназы K, 3 – GuSCN, 4 – HEWL, 5 – HEWL/SDS, 6 – EndoRB43, 7 – EndoRB43/SDS, 8 – EndoRB49, 9 – EndoRB49/SDS, 10 – EndoRB49/HEWL, 11 – EndoRB49/HEWL/SDS

Из полученных данных следует, что наиболее широко применяемые методы (столбики 1–3 на диаграммах рисунка 2) дают низкий выход ДНК, в 20–25 раз меньший, чем варианты специфического ферментативного гидролиза, что соответствовало нашим ожиданиям, ведь пептидогликан – природная мишень этих ферментов. Наиболее эффективным был EndoRB49 – как один, так и в коктейле с лизоцимом. Важным представляется следующее наблюдение: если для лизоцима обработка SDS в 2–3 раза увеличивала выход ДНК, то эффективность EndoRB49 практически не зависела от наличия детергента. Из этого следует, что применение EndoRB49 позволяет исключить обработку SDS, что сокращает время исследователя и упрощает процедуру выделения ДНК.

Оптимизация процедуры выделения показала, что при краткосрочной обработке коктейлем ферментов различной специфичности – пептидазы EndoRB49 и N-ацетилмурамидазы HEWL – наблюдается выраженный синергетический эффект этих белков (коэффициент синергизма 4.8). Это позволяет сократить время обработки коктейлем ферментов до 5 минут.

Таким образом, как показали сравнительные исследования, пептидаза EndoRB49 и отдельно, и в коктейле с N-ацетилмурамидазой – лизоцимом – является эффективным инструментом для выделения геномной ДНК из клеток *Bacillus megaterium,* а предложенный метод ферментативного гидролиза – многообещающая альтернатива действующим лабораторным методам разрушения клеточной стенки.

## Литература


1. *Bollet C., Gevaudan M.J., de Lamballerie X., Zandotti C., and de Micco P.* A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria / C. Bollet // Nucleic Acids Research. – 1995. – Vol. 19, № 8.
2. *Данилевич В.Н., Гришин Е.В.* Способ получения ассоциированной с клеточными оболочками денатурированной геномной ДНК дрожжей и грамположительных бактерий RU 2317995 C2 / В.Н. Данилевич // Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 27.02.2008. – № 6.
3. *Wilson K.* Preparation of Genomic DNA from Bacteria / K. Wilson // Current Protocols in Molecular Biology – 1997. – 2.4.1-2.4.5
4. *Marmur J.* A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms / J. Marmur // J. Mol. Biol. – 1961. – № 3. – P. 208–218.
5. *Shadrin V.S., Machulin A.V., Dorofeeva L.V., Chernyshov S.V., Mikoulinskaia G.V.* Lysis of cells of diverse bacteria by l,d-peptidases of Escherichia coli bacteriophages RB43, RB49 and T5/ V.S. Shadrin // J. Appl. Microbiol. – 2021. – № 130(6). – P. 1902–1912.


# Исследование биопленкообразования ризосферных штаммов *Pseudomonas* sp.


*Чубукова О.В.[1,2], Вершинина З.Р.[1,2], Нигматуллина Л.Р.[1,2], Симороз Е.В.[2], Чумакова А.К.[2]*

[1] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», chubukova@bk.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38051


За последние десятилетия значительно усилилось техногеннное воздействие на окружающую среду, что привело в том числе к бесконтрольному загрязнению почвы пестицидами, тяжелыми металлами и другими экополлютантами. Поэтому, в настоящее время остро стоит вопрос о поиске экологически безопасных способов улучшения состояния почвы, повышения урожайности сельхозкультур. Одним из них является использование так называемых plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), ростстимулирующих ризобактерий, способных усиливать рост и продуктивность растений за счет различных механизмов: синтеза фитогормонов, антибиотиков, сидерофоров и др. (Vejanetal., 2016). Значительная часть

ризосферной микрофлоры представлена грамотрицательными бактериями из рода *Pseudomonas* sp. По данным литературы многие почвенные псевдомонады, например, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens,* могут оказывать положительное воздействие на растения (Chuetal., 2019). Цель нашей работы заключалась в поиске и исследовании биопленкообразования ризосферных штаммов *Pseudomonas* sp., которые потенциально могут обладать свойствами PGPR бактерий.

Нами был проведен скрининг штаммов бактерий, выделенных из клубеньков бобовых растений Южного Урала. Для идентификации изолированных штаммов была амплифицирована и секвенирована 16S РНК данных бактерий. По результатам исследования были отобраны 4 штамма, относящиеся к *Pseudomonas* sp.: OBA 2.4.1, OBA 2.9, Rga 4.17, Oar 3, выделенные, соответственно, из клубеньков остролодочника башкирского, козлятника восточного, стальника полевого. 16S РНК данных штаммов была депонирована в базе данных GenBank под номерами SUB10332594 OBA OK040062, SUB10332309 OBA OK039351.

Были изучены особенности формирования биопленок штаммами *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, OBA 2.9, Rga 4.17, Oar 3 на инертных поверхностях при использовании различных питательных сред, Выявлено, что вышеуказанные штаммы псевдомонад формировали биопленки на поверхности полистироловых планшетов как в богатых веществами средах LB, HM, так и в безбелковых углеводных средах YM, RDM. При этом наилучшее биопленкообразование среди исследованных псевдомонад показал штамм OBA 2.4.1.

Для визуализации взаимодействия с корнями растений исследуемые штаммы псевдомонад были трансформированы векторной конструкцией pJN105TurboGFP на основе плазмиды широкого круга хозяев pJN105, содержащей репликон pBBR1, а также ген зеленого флуоресцентного белка *gfp* под контролем конститутивного промотора T5. С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что штаммы *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, OBA 2.9, Rga 4.17, Oar 3, содержащие плазмиду pJN105TurboGFP, образовывали зрелые биопленки на поверхности корней растений томата.

В дальнейшем планируется изучить ростстимулирующие свойства исследуемых штаммов псевдомонад на различных видах растений.

*Работа была выполнена в рамках госзадания (тема №АААА-А21-121011990120-7) и Программы создания и функционирования карбонового полигона на территории Республики Башкортостан «Евразийский карбоновый полигон» на 2021-2022 годы.*

## Литература

1. *Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq Boyce A.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability. Molecules. 2016. V. 21(5):573. https://doi.org/10.3390/molecules21050573.
2. *Chu T.N., Tran B.T.H., Van Bui L., Hoang M.T.T.* Plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana.* BMC Res Notes. 2019. V. 12(1). doi: 10.1186/s13104-019-4046-1.

# Исследование способности бактерий рода Rhodococcus к деколоризации кристаллического фиолетового с оценкой динамики его биокаталитической трансформации

*Чугунова Ю.А., Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А.*

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», г. Краснодар,
tchugunowa.yuliya2018@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38052

Трифенилметановые красители (кристаллический фиолетовый, малахитовый и бриллиантовый зеленый) нашли широкое применение в медицинском сообществе (окраска микроорганизмов, бактериостатические агенты), а также в текстильной, бумажной, пищевой и фармацевтической промышленности.

Большой процент красителей попадает в сточные воды предприятий и, благодаря своей чрезвычайной устойчивости, надолго сохраняется в водных экосистемах в неизменном виде. Трифенилметановые красители представляют серьезную опасность для окружающей среды и здоровья человека, так как обладают мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами. Бактерии рода *Rhodococcus* характеризуются широким спектром ферментативных систем и могут быть использованы для деколоризации данных соединений.

В работе использовали штаммы бактерий рода *Rhodococcus*: *Rhodococcus sp.* J8, *Rhodococcus sp.* F2, *Rhodococcus erythropolis* B2 из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биохимии Кубанского государственного университета. Культивирование бактерий проводили в жидкой среде LB с добавлением кристаллического фиолетового в конечной концентрации 2.5, 10, 17.5, 25 мг/л (6,13–61,3 мкМ), для первичного скрининга способности штаммов к деколоризации красителя использовали раствор кристаллического фиолетового в концентрации 0,2 мг/л. Степень деколоризации анализировали спектрофотометрически на приборе LEKI SS2107 (АО »ЛоиП», Россия) при длине волны 590 нм. Степень деколоризации красителя (%) рассчитывали по формуле: % деколоризации = $100 \times A_{нач} – A_{кон}/A_{нач}$, где $A_{нач}$ – начальное поглощение, $A_{кон}$ – конечное поглощение красителя после культивирования. Удельная скорость реакции деколоризации была вычислена по формуле: $V = \Delta[C]/\Delta[t]$, где $\Delta[C]$ – концентрация субстрата (мкМоль), $\Delta[t]$ – момент времени (ч).

При первичном скрининге на способность воздействовать на краситель, все исследованные штаммы показали высокую степень деколоризации кристаллического фиолетового, взятого в концентрации 0,2 мг/л: *Rhodococcus erythropolis* B2 – 91,8%, *Rhodococcus sp.* F2 – 93,7%, однако, наиболее эффективная деколоризация наблюдалась для штамма *Rhodococcus sp.* J8 – 96,8%. При использовании повышенных на порядки концентраций, предположительно способных вызвать ингибирование реакции, было обнаружено, что, напротив, особенно интенсивно данный штамм обесцвечивал краситель в концентрациях 17,5 мг/л и 25 мг/л – степень деколоризации составила 49,7% и 48,8% соответственно. Максимальная скорость снижения концентрации кристаллического фиолетового наблюдалась в течение первого часа, затем, по мере исчерпания субстрата, постепенно снижалась и, в конечном итоге, выравнивалась, что характерно для интенсивного типа процесса деколоризации – скорость снижения концентрации пропорциональна величине концентрации. Скорость реакции, начиная с точки концентрации субстрата больше, чем 6,13 мкМ (2,5 мг/л), начинала практически монотонно возрастать, по мере увеличения концентрации. Линейный характер роста зависимости говорит об отсутствии признаков насыщения ферментных систем субстратами в исследованном диапазоне концентраций.

Биомасса штамма *Rhodococcus sp.* J8 может быть использована в составе иммобилизованного биокатализатора, обесцвечивающего раствор кристаллического фиолетового в диапазоне концентраций 6,13–61,3 мкМ (2,5–25 мг/л).

## Исследование свойств новой бактериальной пектиново-целлюлозной пленки

*Шарова Т.В., Васильева Т.И., Кленова Н.А.*

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»
ta_sharova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38053

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – перспективный материал, получаемый при культивировании определенных видов бактерий, уже нашедший широкое применение в медицине и различных отраслях промышленности. (К.С. Болотова и др., 2016; S. Saska et al., 2011) Известно, что БЦ может образовывать комплексы с различными соединениями с приобретением новых свойств (Т.И. Громовых и др., 2015). Представляет определенный интерес получение материала на основе БЦ с пектином, т.к. он обладает противовоспалительными, гемостатическими и антиоксидантными свойствами. Раневые покрытия и по-

вязки, содержащие в своем составе пектиновые вещества, способствуют лучшему и быстрому заживлению ран, эффективно изолируют раны от окружающей среды.

Целью данного исследования стало получение пленок бактериальной целлюлозы с содержанием пектина и изучение их свойств.

## Методы исследования

В ходе экспериментов были получены образцы бактериальных целлюлозных пленок способом культивирования бактерий *Gluconacetobacter sucrofermentans H-110* и *Medusomyces gisevii* на среде HS (S. Hestrin, Schramm; В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, Н.А. Пестов, 2014), и бактериальных пектиново-целлюлозных пленок, для получения которых использовалась среда HS с добавлением пектина яблочного в концентрации 10 г/л. Культура *Gluconacetobacter sucrofermentans H-110* была любезно предоставлена кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского государственного университета имени Николая Платоновича Огарева. Культура *Medusomyces gisevii* была получена нами из чайного гриба методом очистки с помощью клонирования. Для очистки пленку БЦ промывали вначале в дистиллированной воде, затем помещали в 0,5% раствор NaOH на 24 часа при температуре 25–27 °С. После промывки в дистиллированной воде пленку помещали в 0,5%-ный раствор соляной кислоты на 24 ч, после чего промывают дистиллированной водой до получения реакции промывочных вод pH 6–7 и высушивали на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы.

Для того, чтобы подтвердить встраивание молекул пектина в структуру бактериальной целлюлозы использовали карбазол-серный метод для определения содержания пектина в среде культивирования после образования пленок (K.A. Taylor, J.G. Buchanan-Smit, 1992). А также сравнение структуры целлюлозных пленок методом снятия ИК спектров с помощью Фурье-спектрофотометра ФСМ-2201 (ООО «Инфаспек», Россия).

Антибактериальные свойства изучали диск-диффузионным методом, используя суточные инокулянты тест-культур *E. coli* M17 и *S. epidermidis*. Для этого изготавливали диски стандартного размера из бактериальной целлюлозной и пектиново-целлюлозной пленок и фильтровальной бумаги, стерилизовали их, затем выдерживали в 0,01%-ном растворе мирамистина в течение часа. Об антибактериальном действии судили по зонам отсутствия роста вокруг образцов после односуточного роста на МПА при температуре 30 °С.

Результаты исследования. Концентрация пектина в культуральной жидкости после извлечения гель-пленок была в 20 раз ниже изначальной, что говорит об использовании микроорганизмами пектина при производстве бактериальной целлюлозы. При сравнении структуры бактериальных целлюлозных пленок с пектином и без него методом ИК-спектрометрии были обнаружены различия в области волновых чисел 810–950 $см^{-1}$, которые характерны для пектиновых соединений, что так же говорит о встраивании пектина в структуру БЦ.

В результате исследования были отмечены антибактериальные свойства пектиново-целлюлозной пленки в отношении культуры *E. coli*, так как появляются зоны отсутствия роста, превышающие диаметр диска в среднем на 26%, по сравнению с пленками без пектина, которые таких свойств не проявляли. Однако диски из данных пленок и диски из фильтровальной бумаги, выдержанные в мирамистине, проявляли антибактериальный эффект почти вдвое больший, что свидетельствует о дополнительном воздействии мирамистина. Диски из фильтровальной бумаги, выдержанные в мирамистине, обладали такими же антибактериальными свойствами, как и диски из пектиново-целлюлозной пленки, выдержанные в мирамистине. Это можно объяснить тем, что фильтровальная бумага обладает более сильными абсорбционными свойствами, чем целлюлозная пленка, имеющая гладкую текстуру. После высушивания выдержанных в мирамистине образцов БЦ антибактериальный эффект сохранялся и был выше на 30% у пектиново-целлюлозной пленки по сравнению с такой же пленкой без пектина.

При изучении влияния образцов на культуру *S. epidermidis* было установлено, что пектиново-целлюзная пленка с мирамистином до высушивания проявляла антибактериальный эффект на 20% выше, чем такая же пленка без пектина. После высушивания этот эффект сохранялся, хотя и был менее выражен.

Полученные результаты показывают, что пленки бактериальной целлюлозы, выращенные с добавлением пектина и выдержанные в мирамистине, могут использоваться в медицине в качестве антибактериальных покрытий раневых поверхностей, а также при лечении некоторых кожных заболеваний, так как они подавляют рост микроорганизмов.

## Литература

1. *Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Гурьянова А.А.* Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2016. № 6. С. 153–165.
2. *Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M.M., Marchetto R., Ribeiro S.J.L., Messaddeq Y.* Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration // International Journal of Biomaterials. 2011. V. 2011. P. 1.
3. *Громовых Т.И., Луценко С.В., Данильчук Т.Н., Фельдман Н.Б., Фан Ми Хань.* Перспективы направленного использования бактериальной целлюлозы в медицине // МНО «Inter-Medical». ГБОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. 2015. № 7(13). С. 25–37.
4. *Hestrin S., Schramm M.* Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum // Biochemical journal. 1954. № 58(2). P. 345–352.
5. *Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А.* Получение бактериальной целлюлозы и нанокомпазиционных материалов. Саранск: из-во Мордовского университета, 2014. 128 с.
6. *Taylor K.A., Buchanan-Smith J.G.* A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic //Analytical Biochemistry. 1992. V. 201. I. 1. P. 190–196.


# Получение красных пигментов бактерий рода *Dietzia* и их частичная характеристика


*Шуненкова Д.И.[1], Егорова А.Д.[2], Понаморева О.Н.[1], Коломыцева М.П.[2]*

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», г. Тула

[2] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (ИБФМ РАН), ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, dasha.shunenckova@yandex.ru



DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38054


Получение красителей из бактериальных клеток является относительно новым направлением в производстве красителей, позволяющем быстро и дешево получать в достаточном количестве целевые соединения и имеющим преимущество перед традиционными способами получения красителей (природных красителей из растений и синтетических красителей) (Venil et al., 2020). Актуальность данной темы заключается в необходимости поиска новых натуральных красителей из микробных ресурсов, которые были бы безопаснее синтетических. Особый интерес исследователей привлекают бактериальные красно-оранжевые пигменты, чаще всего обладающие антиоксидантными, антибактериальными, фунгицидными, канцеролитическими и цитотоксическими свойствами (Venil et al., 2020).

К красным бактериальным пигментам относятся продигиозины и ксантины. Ксантины обладают множеством лечебных и оздоровительных свойств, а также используются в нутрицевтиках, косметике, фармацевтических препаратах, и их использование, вероятно, будет расширяться в ближайшие годы (Rebelo et al., 2020). Продигиозин же привлекает внимание из-за его широкого спектра биологической активности, в том числе противомалярийных, фунгицидных и канцеролитических свойств. Установлено, что продигиозин способен запускать апоптоз злокачественных раковых клеток (Venil et al., 2014).

В качестве объектов исследования в настоящей работе использовали четыре штамма микроорганизмов рода *Dietzia* из коллекции лаборатории энзиматической деградации органических соединений (ИБФМ РАН).

Был проведен поиск оптимальных условий культивирования бактерий с целью получения целевых пигментов. Для этого было осуществлено погружённое культивирование бактерий на минеральной среде Горлатова с добавлением сахаров (глюкозы, мальтозы или арабинозы) в качестве единственного источника углерода и энергии. Измерение оптической плотности показало, что все протестированные бактерии рода *Dietzia* хорошо растут только в присутствии глюкозы, однако практически не образуют целевой пигмент.

Исследование продукции красных пигментов в ходе твердофазного и погруженного культивирования исследуемых бактерий с использованием богатых питательных сред (LB, мальт экстракта и соевой муки) показало высокий выход пигмента в среде LB в течение 2 суток. При погруженном культивировании бактериальных клеток в питательных средах, содержащих соевую муку и мальт экстракт, рост бактерий не наблюдался на протяжении всего времени культивирования.

Были оптимизированы условия экстракции пигментов из клеток бактерий с использованием таких систем растворителей, как хлороформ:метанол (1:1), 96% этанол, этилацетат:вода (1:1). С помощью тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ полученных экстрактов выделены целевые красные пигменты.

Согласно спектрофотометрическим измерениям полученных экстрактов клеток, пигменты бактерий рода *Dietzia* имели максимум поглощения в диапазоне 474–480 нм, соответствующий диапазону поглощения промышленно ценных бактериальных ксантинов и продигиозинов, что открывает возможности их дальнейшего исследования.

*Работа поддержана Минобрнауки РФ в рамках Госзадания FEWG-2020-0008.*

## Литература

1. *Venil C.K., Dufossé L., Renuka Devi P.* Bacterial pigments: sustainable compounds with market potential for pharma and food industry // Frontiers in Sustainable Food Systems. – 2020. – Vol. 4. – P. 1–17.
2. *Rebelo B.A., Farrona S., Rita Ventura M., Abranches R.* Canthaxanthin, a red-hot carotenoid: applications, synthesis, and biosynthetic evolution // Plants. – 2020. – Vol. 9. – №. 8. – P. 1039.
3. *Venil C.K., Aruldass C.A., Dufossé L., Zakariac Z.A., Ahmad W.A.* Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry–an incisive evaluation // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – №. 74. – P. 39523–39529.

# Элиситоры MAMP-типа, продуцируемые непатогенными изолятами фузариев, обеспечивают эффективную защиту различных сортов пшеницы и томата от фитопатогенных грибов

*Щербакова Л.А., Джавахия В.Г.*

Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Большие Вязёмы, Московская область, larisavniif@yahoo.com

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38055

Химические пестпициды значительно снижают потери урожая от фитопатогенов, однако интенсивное применение этих ксенобиотиков связано с целым рядом нежелательных последствий для окружающей среды. Одной из стратегий защиты сельскохозяйственных культур, способствующих снижению пестицидной нагрузки в агроценозах, может быть индуцирование системной устойчивости растений (СУ) к болезням с помощью биогенных элиситоров, в роли которых выступают молекулярные паттерны (Microbe Associated Molecular Pattern – MAMP) микроорганизмов [1]. Исследование разнообразия почвообитающих микромицетов, населяющих ризосферу пшеницы и томата, позволило нам выделить непатогенные изоляты фузариевых грибов и идентифицировать у двух из них элиситоры белковой природы, а именно: цистеин-содержащий белок CS20EP *Fusarium oxysporum* CS-20, индуцирующий СУ к вилту томата [2], а также выделенные из мицелия или культуральной жидкости *F. sambucinum* FS-94 индукторы СУ к корневым гнилям злаковых или септориозу колоса (далее IP74 и EC/E74 соответственно) [3, 4]. Исследование механизмов действия этих белков показало, что они относятся к элиситорам MAMP-типа и индуцируют такие неспецифические защитные ответы растений, как обратимое изменение ионного обмена на плазмалемме, активацию и прайминг салицилат-зависимой сигнальной системы растений [2, 4, 5], усиление экспрессии генов антимикробных пептидов и прайминг генов, кодирующих белки PR-1 и PR-5 – медиаторы системной приобретенной устойчивости [3, 4, 6]. Однако до сих пор защитный эффект этих элиситоров был продемонстрирован только на двух сортах яровой пше-

ницы и одном сорте томата. Между тем, для разработки технологии их применения важно располагать данными, подтверждающими, что неспецифичность механизмов действия CS20EP, IP74 и EC/E74 обеспечит защиту разных сортов растений от соответствующих патогенов. В связи с этим мы исследовали уровень защитного эффекта IP74 и EP74 на 6 сортах яровой и 2 сортах озимой пшеницы при поражении их возбудителями фузариозной корневой гнили (*Fusarium* spp.) или септориоза колоса (*Parastagonosporum nodorum*), а также эффективность CS20EP против васкулярного вилта (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici – FOL*) на трех сортах томата.

Для выделения CS20EP и IP74 из мицелия грибов использовали экстракцию буферными растворами и эксклюзионную хроматографию [2, 3]. EC/E74 выделяли из фильтрата культуральной жидкости с помощью ультрафильтрации [4]. Защитный эффект IP74 против фузариозной корневой гнили оценивали на проростках пшеницы, выращенных из обработанных элиситором инфицированных семян (по 200 семян каждого сорта). Эффективность защитного действия CS20EP оценивали после обработки им корней растений томата (12 растений/сорт) и последующей их инокуляции микроконидиями патогенных изолятов *FOL* F37 или Fot3 [2, 5]. EP74 наносили на вторые листья выращенных до стадии трех листьев проростков пшеницы (25 растений/сорт), за сутки до опрыскивания растений суспензией спор *P. nodorum*. Опыты повторяли трижды. Элиситоры использовали в виде водных растворов (500 мкг белка/мл), а контрольные образцы растений и семян обрабатывали водой. Распространенность корневой гнили (ISN%), степень развития болезней (DI%) и средний балл поражения растений, выращенных в контролируемых условиях, определяли, как описано ранее [2–5]. Обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 6.1.

Установлено, что эффективность защиты пшеницы и томата элиситорами MAMP-типа изолятов FS-94 и CS-20 не зависела от сорта обработанного растения.

*Таблица 1*

**Влияние обработки семян MAMP-элиситором IP74 изолята FS-94 на развитие фузариозной корневой гнили проростков различных сортов яровой и озимой пшеницы**

| Сорта | Вариант обработки семян | ISN%* | DI%* | Биологическая эффективность (БЭ)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ISN% | DI% |
| ЯРОВЫЕ | | | | | |
| Аркас | IP74 | 17,3±1,0 | 6,9±0,3 | 42,3 | 40,0 |
| | $H_2O$ | 30,0±2,2 | 13,2±0,2 | | |
| Добрыня | IP74 | 30,0±0,1 | 10,2±0,6 | 40,5 | 39,3 |
| | $H_2O$ | 50,4±2,5 | 16,8±0,1 | | |
| Злата | IP74 | 25,8±1,7 | 9,4±0,2 | 44,8 | 40,9 |
| | $H_2O$ | 46,7±2,7 | 15,9±0,4 | | |
| Саратовская 42 | IP74 | 22,1±0,8 | 6,4±0,4 | 34,7 | 40,2 |
| | $H_2O$ | 33,8±1,4 | 10,7±0,2 | | |
| Саратовская 55 | IP74 | 11,2±0,2 | 4,7±0,2 | 43,5 | 42,4 |
| | $H_2O$ | 19,8±1,8 | 8,2±0,3 | | |
| Энита | IP74 | 37,4±1,4 | 12,0±0,5 | 38,1 | 47,2 |
| | $H_2O$ | 60,4±4,9 | 22,7±1,1 | | |
| ОЗИМЫЕ | | | | | |
| Мироновская 808 | IP74 | 28,9±1,2 | 12,6±0,6 | 32,3 | 45,5 |
| | $H_2O$ | 42,7±3,0 | 23,1±0,7 | | |
| Московская 39 | IP74 | 37,9±1,7 | 20,8±0,7 | 39,6 | 45,8 |
| | $H_2O$ | 62,7±4,6 | 38,4±0,5 | | |

* Отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$ (*t*-тест для независимых переменных).
** БЭ примерно одинакова для всех сортов (различия при $p = 0,05$ недостоверны).

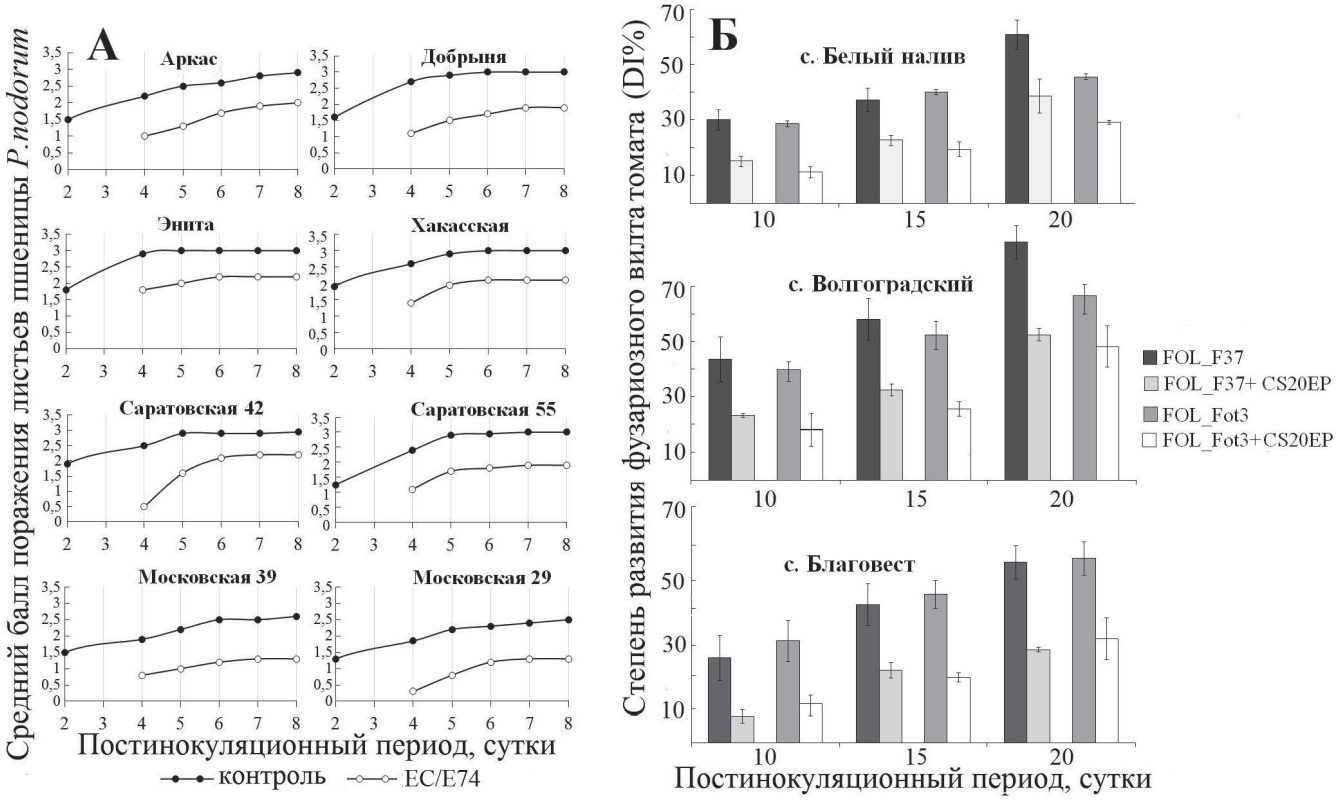



**Рис. 1.** Влияние MAMP-элисторов изолятов FS-94 (EC/E74) и CS-20 (CS20EP) на развитие септориоза пшеницы (А) и фузариозного вилта томата (Б) у разных сортов этих растений

Проростки всех 8 сортов пшеницы, выращенные из контрольных семян, были поражены фузариозной корневой гнилью. Хотя проявление болезни у разных сортов (особенно в случае яровой пшеницы) варьировало в довольно широких пределах, обработка семян IP74 изолята FS-94, приводила к достоверному снижению числа проростков с симптомами корневой гнили и степени их поражения у всех сортов пшеницы (табл. 1). Суммарная биологическая эффективность защиты в результате сокращения числа пораженных проростков и ослабления симптомов заболевания была не ниже 75%, лишь незначительно различалась от сорта к сорту и не зависела от уровня исходной семенной инфекции.

Анализ динамики развития септориоза на листьях проростков пшеницы, которые за сутки до инокуляции *P. nodorum* обрабатывали EC/E74, показал, что данный элиситор препятствует развитию заболевания на всех использованных в опытах сортах (рис. 1А), а индуцированная ими СУ вносит существенный вклад в защитный эффект. Так, подавление болезни на необработанных листьях третьего яруса после нанесения EC/E74 на вторые листья составляло 40–45%, что было лишь на 5–8% ниже уровня защитного эффекта на обработанных листьях второго яруса (45–55%), обусловленного локальной устойчивостью.

Контакт корневой системы проростков томата с CS20EP, предшествующий заражению растений патогенными изолятами *FOL*, приводил к значительному ослаблению симптомов вилта и одинаково эффективно сдерживал его развитие как на восприимчивых ко всем расам возбудителя сортах томата, так и на относительно устойчивом сорте Благовест (рис. 1Б).

Продемонстрированное в данном исследовании отсутствие сортовой специфичности защитного эффекта биогенных элиситоров свидетельствует о перспективности их использования в системах интегрированной защиты пшеницы и томата от вызывающих серьезные потери урожая фитопатогенных грибов.

## Литература

1. *Mackey D., McFall A.J.* MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. Mol. Microbiol., 2006, 6:1365–1371.

2. *Shcherbakova L.A.; Odintsova T.I.; Stakheev, A.A.; et al.* Identification of a novel small cysteine-rich protein in the fraction from the biocontrol *Fusarium oxysporum* strain CS-20 that mitigates Fusarium wilt symptoms and triggers defense responses in tomato. Front Plant Sci., 2016, 6: 1–15.
3. *Shcherbakova L., Nazarova T., Mikityuk O., et al.* An extract purified from the mycelium of a tomato wilt-controlling strain of *Fusarium sambucinum* can protect wheat against Fusarium and common root rots. Pathogens. 2018, 7(3): e61.
4. *Shcherbakova L.; Semina Yu.; Dzhavakhiya V.G., et al.* Potential for integrated control of the wheat pathogen, *Stagonospora nodorum*, by Folicur and extracellular compounds produced by isolate FS-94 of *Fusarium sambucinum*. IOBC-WPRS Bull., 2014, 89: 455–458.
5. *Shcherbakova L.A., Nazarova T.A., Mikityuk O.D., et al. Fusarium sambucinum* isolate FS-94 induces resistance against Fusarium wilt of tomato via activation and priming of a salicylic acid-dependent signaling system. Russ. J. Plant Physiol., 2011, 58: 808–818.
6. *Щербакова Л.А., Одинцова Т.И., Сёмина Ю.В.* Активация сигнальных систем растений микробными агентами биоконтроля и их метаболитами при формировании системной устойчивости к фитопатогенам. В сб. «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений», Казань, 2016. С. 176–177.

# Антимикробная активность мицелиальных актинобактерий, выделенных из кишечника тропических диплопод

*Якушев А.В.[1], Ефименко Т.А.[2], Карабанова А.А.[2], Демьянкова М.В.[2], Глухова А.А.[2], Грачёва Т.А.[1], Ефременкова О.В.[2]*

[1] Факультет почвоведения МГУ, Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38056

Одной из глобальных проблем настоящего времени является антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов при отсутствии достаточного числа эффективных антимикробных препаратов. Таким образом, актуальной задачей является скрининг продуцентов антимикробных соединений, преодолевающих множественную лекарственную устойчивость, и создание лекарственных средств, как одна из мер комплексного решения борьбы с инфекционными заболеваниями.

Целью исследования являлось исследование антимикробных спектров мицелиальных актинобактерий, выделенных из кишечного тракта многоножек родов *Nadyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha sp.* и их кормового субстрата (гнилой древесины и листового опада, соответственно, для того, чтобы выявить штаммы продуцентов антибиотиков, активных в отношении мультирезистентных форм патогенных микроорганизмов. Антибиотическую активность культуральных жидкостей определяли методом диффузии в агар по отношению к 11 штаммам бактерий и грибов, в том числе антибиотикорезистентных.

Из кишечника диплопод родов *Nadyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha sp*. и их кормового субстрата выделены 43 штамма актинобактерий, проведена их видовая идентификация на основании анализа гена 16S рРНК, и изучена антимикробная активность в отношении 11 тест-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов. Выявлена высокая доля антибиотически активных штаммов: из кишечника *Nedyopus dawydoffiae* – 81% (13 из 16 штаммов); гнилой древесины – 100% (10 из 10 штаммов); кишечника *Orthomorpha sp.* – 83% (5 из 6 штаммов); листового опада – 100% (11 из 11 штаммов). Все 39 штаммов, продуцирующие антимикробные вещества, обладали активностью в отношении тест-штаммов грибов, 36 штаммов – в отношении грамположительных и 6 штаммов – в отношении грамотрицательных тест-штаммов бактерий. Среди них 25 штаммов проявляли активность в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), 35 – в отношении *Leuconostoc mesenteroides* (VRLM) устойчивого к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина, и 2 – в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью.

Видовая идентификация отобранных актинобактерий – продуцентов антибиотиков на основании анализа последовательности гена 16S рРНК показала, что все штаммы, выделенные из кишечника *Nedyopus dawydoffiae*, принадлежат к роду Streptomyces. Штаммы, выделенные из гнилой древесины, показали принадлежность к нескольким родам: *Kitasatospora, Nocardiopsis, Streptomyces*. Штаммы, выделенные из кишечника *Orthomorpha sp.* – к 3 родам *Micromonospora, Saccharopolyspora, Streptomyces*. Штаммы, выделенные из листового опада – к 4 родам актинобактерий: *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Lechevalieria*, *Streptomyces*.

В ходе факторного анализа антимикробных спектров было установлено, что продуценты отличаются друг от друга по силе антагонизма (сумма диаметров зон подавления всех тест-культур), но по этому показателю не различаются штаммы, выделенные из разных субстратов. По непараметрическому дисперсионному анализу штаммы из листьев картофеля и древесины отличаются зоной подавления на *L. mesenteroides*, *S. cerevisiae*, *A. niger*. Дискриминантный анализ установил различия у штаммов, выделенных из древесины, опада, кишечника *Orthomorpha sp.*, листьев картофеля и личинок *L. decemlineata*. Штаммы из имаго *L. decemlineata* не отличаются от выделенных из листьев, а штаммы из кишечника *N. dawydoffiae* не отличаются от штаммов из гнилой древесины. Различия связаны с относительно более сильным антагонизмом к одним тест-штаммам, чем к другим и не сводятся к простым для понимания отличиям (грибы – бактерии, грам(+) – грам(-), резистентные – чувствительные штаммы).

Богатое видовое разнообразие актинобактерий, выделенных из кишечников диплопод и их кормовых субстратов, а также проявленная ими высокая антибиотическая активность, представляют большой потенциал данной экологической группы для изысканий штаммов – продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость. Различия в спектрах кишечных актиномицетов у разных животных обусловлены не только их транзитом из корма, но и селективным воздействием кишечной среды, что указывает на экологическую значимость их антимикробной активности в кишечнике.

*Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал», № 121040800174-6.*

## Биовыщелачивание никеля из силикатной железо-никелевой руды

*Ячкула А.А.*

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
repinaalenk@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.38057

Гидрометаллургическая добыча металлов осуществляется методами кислотного химического и биологического выщелачивания. Эти подходы являются экономически выгодными по добыче металлов из бедных руд, но вызывают загрязнение кислотными отходами и закисление территорий добычи. Ведущие промышленные виды выщелачивающих микроорганизмов представлены ацидофильными автотрофными бактериями или археями. Выбор таких штаммов связан с тем, что сильные ацидофильные бактерии производят серную кислоту путем окисления минеральных сульфидов и / или увеличивают окислительно-восстановительные значения за счет окисления железа, бактериальная автотрофия исключает необходимость поддерживать промышленный процесс органическими веществами. ростовые субстраты. Один из самых популярных видов выщелачивающих бактерий – *Acidithiobacullus ferrooxidans*, который может окислять как минеральные сульфиды, так и $Fe^{2+}$, расти при pH < 3,0 и синтезировать свою биомассу из углекислого газа [1]. Применение ацидофильных автотрофных бактерий для выщелачивания металлов в основном ограничено сульфидными рудами. Sukla с соавторами [2] показали, что при выщелачивании никеля из силикатной руды *A. ferrooxidans* уступал в результатах нейтрофильным *Bacillus circulans* и *Aspergillus niger.*

Вместе с этим в последнее время появились публикации, показывающие, что *A. ferrooxidans* может быть также применен для добычи никеля из латеритных руд, если они обогащены железом, которое могло бы служить источником энергии для этих автотрофных бактерий [3, 4].

В настоящем сообщении приведена краткая информация о наших экспериментах по проверке возможности выщелачиванию никеля из проб бедной силикатной железо-никелевой руды. Руда предоставлена из месторождения, где в настоящее время выщелачивание осуществляется путем кучного выщелачивания серной кислотой, добавляемой к руде в весовых отношениях 1:1, и длится до 2 месяцев и более. Для выщелачивания нами был использован выделенный из казахского сульфидного месторождения штамм *A. ferrooxidans* TFBk [5]. Выщелачивание проводили при pH 1,7 в минеральной среде 9К в качалочных колбах (180 об/мин) при 29 ºС. В колбы вносили 20 г руды в 200 мл среды. В ходе экспериментов выщелачивание никеля составило 65 мг Ni/л, т.е. 8,9% никеля от максимально возможного уже за первые 4 суток роста бактерий. Таким образом, нами показана возможность использования бактерий *A. ferrooxidans* для биовыщелачивания никеля из бедной железо-никелевой латеритной руды.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки высшего образования РФ №. 075-15-2021-968.

## Литература

1. *Campodonico M.A., Vaisman D., Castro J.F., Razmilic V., Mercado F., Andrews B.A., Feist A.M., Asenjo J.A. Acidithiobacillus ferrooxidans*'s comprehensive model driven analysis of the electron transfer metabolism and synthetic strain design for biomining applications, Metab. Eng. Commun. 2016, 3, 84–96. https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.03.003.
2. *Sukla, L.B., Panchanadikar, V.V. & Kar, R.N.* Microbial leaching of lateritic nickel ore. World J. Microbiol. Biotechnol. 1993, 9, 255–257. https://doi.org/10.1007/BF00327850
3. *Behera, S.K., Mulaba-Bafubiandi, A.F.* Advances in microbial leaching processes for nickel extraction from lateritic minerals – A review. Korean J. Chem. Eng. 2015, 32, 1447–1454. https://doi.org/10.1007/s11814-015-0085-z
4. *Nasab M.H., Noaparast M., Abdollahi H.* Direct and indirect bio-leaching of co and ni from an iron-rich laterite ore using *Delftia acidovorans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. JME. 2021, 12, 471–489.
5. *Агеева С.Н.* Фенотипический и генотипический полиморфизм штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 : Москва, 2003 190 с. РГБ ОД, 61:04-3/473

**Научное издание**

# VII ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»

## Школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов

## «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»

***6-9 декабря 2021 г.***

**Сборник материалов конференции**

Подписано к печати 25.11.2021.
Формат 62x94/8. Печать офсетная.
Бумага офсетная, 80 г/м$^2$. Уч.-изд. 40,0 п.л. Тираж 100 экз.

ООО “Издательство ГЕОС”
125315, 1-й Амбулаторный пр., 7/3–114
Тел./факс: (495) 959-35-16, (499) 152-19-14, 8 926-222-30-91.
E-mail: geos-books@yandex.ru, www.geos-books.ru

Отпечатано с готового оригинал-макета в ОАО “Альянс “Югполиграфиздат”
ООО “Т-Пресс” 400001, г. Волгоград, ул. КИМ, 6