

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

**IX ВСЕРОССИЙСКАЯ ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ»**

*Посвящается памяти выдающегося ученого-биохимика
академика Александра Александровича Баева*

5–7 декабря 2023 г.

Сборник материалов конференции

Москва
ГЕОС
2023

УДК 579.2
ББК 28.4

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

IX Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосфера роль микроорганизмов»: сборник тезисов. М.: ООО «ГЕОС», 2023. 127 с.

ISBN 978-5-89118-877-8

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 978-5-89118-877-8

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание.....	3
СЕКЦИЯ 1	
БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ	
МИКРООРГАНИЗМОВ	8
К 120-летнему юбилею академика А.А. Баева. Первая рекомбинантная ДНК в СССР Солонин А.С., Зимин А.А.	8
SICD в дрожжах <i>S. cerevisiae</i> сопровождается выходом в среду октановой кислоты, которая не является продуктом работы митохондриальной FAS-II системы синтеза жирных кислот Автух А.Н., Баскунов Б.П., Кешелава В.Б., Валиахметов А.Я.	10
Анализ состава и молекулярного профиля мембранных липидов <i>Phaeotremella foliacea</i> в условиях дефицита фосфора Амигуд Е.Я., Сеник С.В., Серебряков Е.Б., Котлова Е.Р.	11
Протеазная активность <i>Trichoderma cf. aureoviride</i> Rifai BKMF-4268D Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.	13
Кинетика восстановления метакрилата RMrd <i>Geobacter sulfurreducens</i> Архипова О.В., Таухутдинова С.Р., Микулинская Г.В., Абашина Т.Н., Захарова М.В.	15
Бактериофаг <i>Lysobacter gummosus</i> 3.2.11 Афошин А.С., Тарлачков С.В., Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Леонтьевская Е.А., Леонтьевская Н.В.	17
Выбор тест культур для определения механизма действия модифицированных алкил-нуклеозидов, перспективных антисептиков для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галерее Бенько Е.А., Авданина Д.А., Ермолюк А.А., Калинин С.Г., Макаров Д.А., Александрова Л.А., Жгун А.А.	18
Анализ динамики SICD в штаммах <i>S. cerevisiae</i> с делетированными генами, вовлечёнными в некоторые ключевые метаболические процессы Валиахметов А.Я.	20
Поиск грибных целлобиозодегидрогеназ класса III Горина С.Ю., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыццева М.П.	21
Продукция сероводорода у бактерий <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Bacillus megaterium</i> при добавлении внеклеточного цистина Егорова В.В., Ушаков В.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	22

Моноклональное антитело HlyIIС15 обеспечивает защиту участка узнаваемого тромбином от его протеолитического действия Замятин А.В., Нагель А.С., Каратовская А.П., Руденко Н.В., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Серегина Е.А., Сиротенко В.С., Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Бровко Ф.А., Солонин А.С.	24
Флавивирусы ракообразных, <i>Cragon cragon</i> и <i>Gammarus chevreuxi</i> , проявляют большое сходство при эволюционном сравнении последовательностей их полибелков методом наибольшей экономии Зимин А.А., Никулина А.Н., Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.В., Назипова Н.Н., Дроздов А.Л., Киселев С.С., Осепчук Д.В., Кощаев А.Г.	25
DELTA-BLAST как средство для эвристических находок сходств полибелка флавивируса IPV <i>Macrobrachium rosenbergii</i> Зимин А.А., Никулина А.Н., Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.В., Назипова Н.Н., Дроздов А.Л., Киселев С.С., Осепчук Д.В., Кощаев А.Г.	27
Геномная и физиологическая характеристики штамма <i>Pseudomonas</i> sp. OVF7, разлагающего углеводороды и образующего биопленки при культивировании на нафталине и <i>n</i> -додекане Иванова А.А., Сазонова О.И., Звонарев А.Н., Делеган Я.А., Богун А.Г., Стрелецкий Р.А., Ветрова А.А.	29
Влияние цiproфлоксацина на уровень и редокс-статус железа в среде и в клетках <i>Escherichia coli</i> в отсутствие и в присутствие цистина Калашникова Т.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	31
Роль полиолов и растворимых сахаров в мицелии грибов вида <i>Aspergillus tubingensis</i> в устойчивости к высоким дозам ионизирующего облучения Крючкова М.О., Иванова А.Е., Данилова О.А., Терешина В.М.	32
Новая бактериолитическая амидаза <i>Lysobacter capsici</i> XL1 Кудрякова И.В., Афошин А.С., Тарлачков С.В., Леонтьевская Е.А., Галемина И.Е., Зеленов Д.В., Леонтьевская Н.В.	34
Неорганические полифосфаты дрожжей: регуляторные функции и практические перспективы Кулаковская Т.В.	35
Оценка чувствительности аденоциантифосфатазы (КФ 3.6.1.3) тест-культуры <i>Clavibacter michiganensis</i> к фракции микробного пигмента штамма <i>Janthinobacterium lividum</i> Ляховченко Н.С.	36
Изучение пробиотических свойств штамма <i>Ligilactobacillus salivarius</i> 7247 и его действия на <i>Salmonella</i> в комбинации с пробиотиком Мачулин А.В., Абрамов В.М.	37
Материально-энергетический баланс метаногенеза Минкевич И.Г.	39
Количество пролиновых остатков в HlyIIСTD определяет его изомеризацию Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Каратовская А.П., Замятин А.В., Ветрова О.С., Иванова Т.Д., Руденко Н.В., Солонин А.С.	40
Замена аминокислотных остатков на поверхности С-концевого домена HlyII <i>Bacillus cereus</i> влияет на доступность конформационных эпитопов Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Мельник Б.С., Ветрова О.С., Сиунов А.В., Каратовская А.П., Замятин А.В., Шляпников М.Г., Руденко Н.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С.	42

Моделирование трансдукции плазмид фагами RB43, RB49 в микробиоте мыши Никулина А.Н., Никулин Н.А., Павлов В.М., Федотова А.Ю., Шорохова А.П., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Зимин А.А.	43
Штамм-нефтедеструктор <i>Rhodococcus qingshengii</i> F2-2: метаболический потенциал и фитостимулирующие свойства Пунтус И.Ф., Чайка Н.Я., Захарченко Н.С., Анохина Т.О., Позднякова-Филатова Т.Ю., Ахметов Л.И., Шутов А.А., Делеган Я.А., Звонарев А.Н., Филонов А.Е.	45
Вторичные метаболиты гриба <i>Penicillium thymicola</i> фумихиназолины F и G как потенциальные ингибиторы эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток рака молочной железы Рысцов Г.К., Антипова Т.В., Ренфельд Ж.В., Шляпников М.Г., Земскова М.Ю.	47
Физиологические особенности штаммов дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при нокаут-мутациях генов <i>PPN1</i> и <i>PPN2</i> , кодирующих полифосфатазы Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Кулаковская Т.В.	48
Структура и функции фосфонатазных оперонов у бактерий-деструкторов глифосата рода <i>Achromobacter</i> Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Петракова М.П., Леонтьевский А.А.	50
Изучение метаболизма фосфолипидов мицелиальных грибов и дрожжей методами липидомики Сеник С.В., Манжиева Б.С., Амигуд Е.Я., Хакурова А.А., Серебряков Е.Б., Котлова Е.Р.	52
Культуральные, физиологические, биохимические свойства и полногеномное секвенирование двух штаммов, выделенных из отходов птицефабрики Сенченков В.Ю., Ляховченко Н.С., Никишин И.А., Чепурина А.А., Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Делеган Я.А., Богун А.Г., Соломенцев В.И., Соляникова И.П.	53
Нарушение гомеостаза цистеина у штаммов <i>Escherichia coli</i> при обработке антибиотиками Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	55
Влияние нокаутов генов полифосфатазы <i>PPN1</i> и полифосфатсинтетазы <i>VTC4</i> на особенности роста на этаноле и полифосфаты митохондрий у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Томашевский А.А.	57
Влияние замен Ser-911 и Thr-912 на функционирование РМА1 H+-АТФазы и содержание полифосфатов у дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Томашевский А.А., Петров В.В.	58
<i>In vitro</i> анализ трансляционной регуляции холин-эндолизинового оперона бактериофага T5 Чернышов С.В., Масулис И.С., Микулинская Г.В.	60
СЕКЦИЯ 2 МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	63
Морфо-физиологическая характеристика и биотехнологический потенциал нового штамма <i>Streptomyces anthocyanicus</i> IPS92w Абашина Т.Н., Поливцева В.Н., Носков А.Е., Делеган Я.А., Антипова Т.В., Соляникова И.П., Сузина Н.Е.	63
Цитологические особенности нового изолята ультрамикробактерий <i>Microbacterium</i> sp. Viol – продуцента фиолетового пигмента Абашина Т.Н., Поливцева В.Н., Звонарев А.Н., Шорохова А.П., Носков А.Е., Мачулин А.В., Антипова Т.В., Сорокин В.В., Сузина Н.Е.	64
Молекулярная диагностика микробиологического поражения иконы «Деисус из 13 фигур» из Государственной Третьяковской галереи Авданова Д.А., Башкирова К.Я., Ермолюк А.А., Манагарова О.Д., Колганова Т.В., Воробьева О.Б., Степанов М.Г., Шитов М.В., Жгун А.А.	66

Скрининг стрептомицетов с антимикробной и целлюлазной активностью Боков Н.А.	68
Чувствительность к антибактериальным препаратам актинобактерий из почв разных функциональных зон (на примере Кировской области) Гембицкая Е.А., Широких И.Г.	70
Роль психрофильных микробных сообществ железоредукторов и метаногенов в цикле железа в почвах Арктики Захарюк А.Г., Щербакова В.А.	72
Использование спектроскопии комбинационного рассеяния и SERS для обнаружения грибов-деструкторов произведений живописи Калинин С.Г., Мусаев А.Г., Авданова Д.А., Ермолюк А.А., Волков И.А., Жгун А.А.	73
Видовое разнообразие представителей рода <i>Neisseria</i> в генитальном тракте женщин и мужчин репродуктивного возраста Карпунина Т.И., Оборин Д.А., Годовалов А.П.	76
Микробное разнообразие донных отложений реки Каменка Морозова Е.И., Егорова Д.О.	78
Выделение и идентификация штаммов бактерий, устойчивых тяжелым металлам и антибиотикам, из осадков сточных вод г. Тулы Сизова О.И., Переломов Л.В., Соколов С.Л., Кочетков В.В.	80
Использование соединений железа метаноархеями из Арктических экосистем Трубицын В.Э., Речкина В.И., Захарюк А.Г., Щербакова В.А.	83
СЕКЦИЯ 3	
РЕСУРСНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ	85
Алексей Михайлович Безбородов (1924–2024) (к 100-летнему юбилею ученого) Кувичкина Т.Н.	85
Потенциал арктических грибов <i>Pseudogymnoascus</i> в биосинтезе вторичных метаболитов Антипова Т.В., Зайцев К.В., Желифонова В.П., Тарлачков С.В., Баскунов Б.П., Гришин Ю.К., Кочкина Г.А., Вайнштейн М.Б.	87
Очистка лизиноксидазы от бактериальных эндотоксинов Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.	89
Особенности реакции <i>Fusarium equiseti</i> и <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> на разные концентрации нефти и тяжелых металлов в среде Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Исупова Н.А., Самигуллина Г.З.	90
На что еще способен <i>Gluconobacter oxydans</i> ? Быков А.Г., Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Баскаков С.А., Решетилов А.Н.	92
Потенциал полиненасыщенных жирных кислот для получения бактерицидных веществ Доморощкая Д.А.	94
Характеристика нового штамма <i>Pseudomonas putida</i> Ch2 – деструктора токсичных антропогенных соединений <i>epsilon</i> -капролактама и глифосата Есикова Т.З., Анохина Т.О., Сузина Н.Е., Шушкова Т.В., Соляникова И.П.	95
Биосинтез лимонной кислоты из глюкозных сиропов у дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> Камзолова С.В., Алляров Р.К., Миронов А.А., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А.	96
Биодеградативный потенциал штаммов-деструкторов хлорбифенилов кmono-гидроксилированному бифенилу Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О.	98

Выделение из нефтезагрязненных почв Томской области нового штамма <i>Penicillium</i> sp. I22 и изучение его потенциала для биоремедиации Клишашов И.С., Ивасенко Д.А., Глухова Л.Б., Герасимчук А.Л.	100
Новая грибная стероид-7-гидроксилаза: идентификация гена и функциональная экспрессия в <i>Pichia pastoris</i> Коллеров В.В., Тарлачков С.В., Шутов А.А., Донова М.В.	102
Стимулирующее действие липополисахаридов диазотрофных ризобактерий <i>Azospirillum soli</i> CC-LY788(T) и <i>Azospirillum griseum</i> L-25-5 w-1 на ранних стадиях роста <i>Triticum aestivum</i> L. Кондюрина Н.К., Федоненко Ю.П.	104
Поиск штаммов-деструкторов бифенила в нефтезагрязненных биотопах Королёв Н.А., Егорова Д.О.	106
Выделение пептидов микробиоты кишечника из сыворотки и плазмы крови здоровых доноров Косс В.А., Арапиди Г.П.	107
Профилактическая эффективность новой комплексной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных при смешанных микотоксикозах на лактирующих коровах Косых А.В., Мирошниченко П.В., Данильченко О.Б.	108
Характеристика ксиланаз из штамма <i>Streptomyces spiralis</i> ВКМ Ac-1311 Ларионова А.П., Трубицина Л.И., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.	109
Конверсия холевой кислоты термофильтральными актинобактериями рода <i>Saccharopolyspora</i> Лобастова Т.Г., Донова М.В.	110
Получение биологически активных соединений на основе (–)-изопулегола с использованием клеток <i>Rhodococcus rhodochrous</i> ИЭГМ 1362 Мальцева П.Ю., Лучникова Н.А., Ильина И.В., Ившина И.Б., Салахутдинов Н.Ф.	112
Изучение продукции фенолоксидазных ферментов гриба <i>Fomes fomentarius</i> ВКПМ F-1531 методом твердофазного культивирования на лигноцеллюлозных субстратах Матусевич С.В., Аминева Д.М., Гильмутдинова Э.Р., Халимова Л.Х.	114
Применение модели sn-1,2,3-статистического распределения ацилов жирных кислот в запасных триацилглицеринах микроводорослей из рода <i>Vischeria</i> (штаммы Н-242 и С-70 коллекции IPPAS) для оценки их биотехнологического потенциала Сидоров Р.А., Казаков Г.В., Стариков А.Ю., Синетова М.А.	115
Применение рекомбинантных штаммов <i>Mycobacterium neoaurum</i> в одностадийной трансформации фитостерина в тестостерон Текучева Д.Н., Карпов М.В., Фокина В.В., Тимакова Т.И., Шутов А.А., Донова М.В.	118
Биотехнологический потенциал штаммов <i>Penicillium</i> для утилизации отходов производства пальмового масла Топилина Ю.С., Мостовая А.К., Паталаха А.Е., Ивасенко Д.А., Герасимчук А.Л.	119
Активность гетерологичной стероидной дегидрогеназы KstD2 в различных организмах-хозяевах Фуфаева С.Р., Довбня Д.В., Шутов А.А., Ивашина Т.В., Донова М.В.	121
Исследование влияния вытяжек из лиственных фракций подстилок городской среды в качестве компонентов питательных сред на продуктивность и состав жирных кислот при культивировании микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i> Хлевная В.С., Горин К.В., Грачева Т.А.	123
<i>Serratia</i> sp. Asf1 – продуцент вторичного метаболита Хохлова Г.В., Антипова Т.В., Баскунов Б.П.	125

СЕКЦИЯ 1

БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

**К 120-летнему юбилею академика А.А. Баева.
Первая рекомбинантная ДНК в СССР**

Солонин А.С., Зимин А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН –
обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пущино
solonin.a.s@yandex.ru, zimin@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38676

Ключевые слова: академик Баев А.А., рекомбинантная ДНК, генетическая инженерия.

В этом году исполняется 120 лет со дня рождения выдающегося советского и российского биохимика, врача, учёного – Александра Александровича Баева (28 декабря 1903 [10 января 1904], Чита – 31 декабря 1994, Москва). Основные его работы были посвящены биохимии АТФ и нуклеиновых кислот, молекулярной биотехнологии и генетической инженерии, генетике и молекулярной биологии. Большой отрезок разносторонней жизни и научной работы академика А.А. Баева был связан с ИБФМ АН СССР. Мы попытались описать в этих тезисах возможно наиболее значимую работу, выполненную А.А. Баевым и его коллегами, в стенах нашего института, а именно конструирование первой в СССР и второй в мире рекомбинантной ДНК. А.А. Баев был приглашен Г.К. Скрябиным в ИБФМ АН СССР в начале его формирования. Мечта А.А. Баева о конструировании новых генов, а в дальнейшем и геномов, воодушевляла его соратников. До начала его работы в Пущино в лабораториях, которыми А.А. Баев последовательно руководил в Институте биохимии им. А.Н. Баха и Институте молекулярной биологии АН СССР, проводились исследования структуры и определение нуклеотидной последовательности тРНК [1]. Для этой цели А.А. Баев предложил метод фрагментации молекулы тРНК с помощью специфичных к последовательности нуклеотидов РНКаз [2, 3, 4]. Эти работы ознаменовались определением одной из первых в мире последовательностей тРНК, валиновой тРНК пекарских дрожжей [5, 6]. Коллектив авторов, возглавляемый А.А. Баевым, был награжден за эту работу Государственной премией СССР. Скорее всего, именно в связи получением фрагментов транспортных РНК дрожжей у А.А. Баева появились идеи о необходимости получения специфических фрагментов ДНК для их дальнейшей интеграции (соединения) фрагментов в состав различных геномов.

Формирование в ИБФМ АН СССР лаборатории, а затем и отдела под руководством А.А. Баева было во многом направлено на решение этой задачи, открывавшей новые возможности в фундаментальной молекулярной генетике и промышленной микробиологии, которой занимался директор Института. На

этом этапе под руководством А.А. Баева проходили семинары по обсуждению возможных подходов к решению этих задач и были проведены первые робкие попытки специфической фрагментации ДНК бактериофагов [7, 8]. Серьезным толчком в развитии технологии рекомбинантных ДНК послужила разработка методик электрофоретического разделения фрагментов ДНК в полиакриламидных и агарозных гелях.

Вторым серьезным толчком в этом развитии было появление эндонуклеаз рестрикции, штаммы-продуценты которых удалось получить из-за рубежа. На семинарах лаборатории того периода активно обсуждались не только вопросы связанные с технологией рекомбинантных ДНК, но и идеи возможного определения последовательности нуклеотидов. А.А. Баевым была поставлена задача на конструирование рекомбинантных ДНК и собрана научная группа для решения задачи конструирования первой в СССР рекомбинантной ДНК. Детальное планирование технической части, но уже после бурных обсуждений на семинарах, было осуществлено Н.И. Матвиенко. Отдельные этапы клонирования осуществлялись как Н.И. Матвиенко, так и сотрудниками лаборатории молекулярной биологии и генетики микроорганизмов Таняшиным В.И., Л.Л. Тихомировой, Л. Петровской, В. Ксензенко и А. Солониным. Работа велась с высокой интенсивностью, далеко не всегда участникам этой работы удавалось высаться. Участники работы смогли почувствовать её окончание только после публикации статьи в журнале Доклады АН СССР [9]

В 1975 году в городе Асиломар Стейт Бич, Калифорния, США состоялась конференция по рекомбинантным ДНК, организованная профессором П. Бергом, профессором М. Сингер и их коллегами для обсуждения потенциальных биологических опасностей и регулирования биотехнологии Асиломар Стейт Бич, Калифорния [10]. Группа из примерно 140 специалистов биологов, юристов и врачей приняла участие в конференции, чтобы разработать добровольные рекомендации по обеспечению безопасности технологии рекомбинантной ДНК. Двое участников работы по конструированию первой рекомбинантной ДНК в СССР, А.А. Баев и В.И. Таняшин, стали представителями Асиломарского совещания по безопасности рекомбинантных ДНК от СССР. Это обозначало международное признание СССР как страны, обладающей определенным спектром методов, существенных для развития молекулярной биологии и молекулярной генетики в мире. Это было уже не только научным значением работы по конструированию первой в СССР рекомбинантной ДНК, но и усиливало влияние ученых СССР среди научной общественности всего мира.

Сотрудники отдела А.А. Баева в последующие годы активнейшим образом продолжили конструирование рекомбинантных ДНК с различными исследовательскими и прикладными целями [11–15]. Более сотни коллег из самых разных областей и республик СССР прошли обучение в лабораториях отдела, возглавляемого А.А. Баевым. Многие из них создали лаборатории, в которых эффективно использовали методы генной инженерии на основе обучения в отделе молекулярной биологии и молекулярной генетики ИБФМ АН СССР. Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР обеспечивал многие лаборатории СССР ферментами для молекулярной биологии и генной инженерии.

В июне 1981 года отдельным указом Верховного совета СССР академики А.А. Баев и Г.К. Скрябин за их личный вклад в развитие биологической науки в СССР были награждены орденами Ленина и золотыми медалями Героя социалистического труда. Не стоит думать, что на этом А.А. Баев мог остановиться. Ему было на тот момент всего лишь 77 лет, и для него начинались последние 13 лет его новой чрезвычайно активной жизни, полной новых свершений, новых научных и научно-организационных дел.

На праздновании 85-летия академика А.А. Баева вице-президент АН СССР Ю.А. Овчинников сказал: «Я застал то время, когда кандидат биологических наук А.А. Баев бегал по коридорам Президиума АН СССР». Академик Баев А.А. продолжал это делать, «бегать», и после 1981 года. Таким, никогда не успокоенным до последней минуты его жизни, таким быстрым, стремящимся в каждую секунду его существования понять законы биологической жизни, предложить и внедрить новые методы, выделить главное в биологической науке и сразу донести это до своих учеников, был академик Александр Александрович Баев.

Литература

1. Баев А.А. Структурное исследование рибонуклеиновых кислот. Вестн. Акад. Наук СССР. 11 ноября 1968 г.; том 38 (11), с. 81–85.
2. Абросимова-Амельянчик Н.М., Татарская Р.И., Венкстерн Т.В., Аксельрод В.Д., Баев А.А. Специфичность гуанил-РНКазы актиномицетов. Биохимия. Ноябрь-декабрь 1965, том 30, вып 6, с. 1269–1276.

3. Мирзабеков А.Д., Венкстерн Т.В., Баев А.А. Олигонуклеотиды рибонуклеазного гидролизата суммарной транспортной РНК пекарских дрожжей. Биохимия, 1965, том 30, вып. 4, с. 825–835.
4. Венкстерн Т.В., Ли Л., Крутилина А.И., Мирзабеков А.Д., Аксельрод В.Д., Баев А.А. Первичная структура валиновой транспортной РНК и пекарских дрожжей. Нуклеотидный состав и олигонуклеотиды рибонуклеотиды рибонуклеазных гидролизатов. Докл Акад Наук СССР. 1967 , том 173(2), с. 459–62.
5. Баев А.А., Мирзабеков А.Д., Аксельрод В.Д., Венкстерн Т.В., Ли Л., Крутилина А.И., Фодор И., Казаринова Л. Первичная структура валиновой транспортной РНК 1 пекарских дрожжей. Первичная структура транспортной РНК-1 валина в пекарских дрожжах. Частичная реконструкция молекулы. Докл. Акад. Наук СССР. 1967 марта-апрель; том 173(1), с. 204–207.
6. Баев А.А., Венкстерн Т.В., Мирзабеков А.Д., Крутилина А.И., Ли Л., Аксельрод В.Д. Первичная структура валиновой транспортной РНК1 пекарских дрожжей. Молекулярная биология, 1967, том 1, номер 5, с. 754.
7. Таняшин В.И., Матвиенко Н.И., Солонин А.С., Тихомирова Л.П., Фодор И., Баев А.А. Контролируемая фрагментация ДНК. I. Ацентрический гидродинамический разрыв и возможность выделения групп генов T5 Молекулярная биология. 1974, 8(6):803-15.
8. Fodor I., Matvienko N.I., Zlotnikov K.M., Tanyashin V.I., Solonin A.S., Bayev A.A. Enzymic in vitro repair and chemical nature of DNA chain breaks induced by incorporated phosphorus-32P decay. Nucleic Acids Res. 1975 May;2(5):635-46. doi: 10.1093/nar/2.5.635. PMID: 1096080; PMCID: PMC343616.
9. Тихомирова Л.П., Петровская Л.Л., Таняшин В.И., Солонин А.С., Матвиенко Н.И., Баев А.А. Гибридные молекулы ДНК фага λ и плазмиды ColE1. Докл. Акад. Наук СССР, 1975, том 223, с. 995–998.
10. Berg P., Baltimore D., Brenner S., Roblin R.O. III. Singer M. F. Summary Statement of the Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 72, No. 6, pp. 1981–1984, (June 1975): 1981.
11. Солонин А.С., Таняшин В.И., Баев А.А. Новые плазмидные векторы, содержащие регуляторную область фага лямбда. Докл Акад Наук СССР. 1979;245(3):722-5.
12. Wilson G.G., Tanyashin V.I., Murray N.E. Molecular cloning of fragments of bacteriophage T4 DNA. Mol Gen Genet. 1977 Nov 14;156(2):203-14. doi: 10.1007/BF00283493. PMID: 600265.
13. Мельников А.А., Фодор И., Баев А.А. Получение in vitro векторной молекулы, состоящей из ДНК фага лямбда и плазмиды с детерминантой устойчивости к тетрациклину. Докл Акад Наук СССР. 1977;236(1):237-40.
14. Косых В.Г., Бурьянов Я.И., Баев А.А. Клонирование генов рестриктазы и метилазы EcoRII. Докл Акад Наук СССР. 1979;247(5):1269-71.
15. Стрижков Н.И., Тихомирова Л.П., Баев А.А. Рекомбинантная плазмиды RSF2124-lambdaCD способна самостоятельно интегрироваться в хромосому E. coli. Докл Акад Наук СССР. 1979;244(4):1001-4.

SICD в дрожжах *S. cerevisiae* сопровождается выходом в среду октановой кислоты, которая не является продуктом работы митохондриальной FAS-II системы синтеза жирных кислот

Автух А.Н.¹, Баскунов Б.П.¹, Кешелава В.Б.², Валиахметов А.Я.¹

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

² ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биологического приборостроения)

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38677

Ключевые слова: дрожжи, SICD, октановая кислота, липоевая кислота, ROS, FAS-II.

Инкубация дрожжей *S. cerevisiae* с глюкозой, в отсутствии других питательных веществ, приводит к SICD (Sugar Induced Cell Death), сопровождающаяся ростом количества клеток с повышенным со-

держанием ROS. Анализируя состав среды инкубации, мы обнаружили октановую кислоту (OA), но не другие карбоксильные кислоты. При этом её концентрации (0.675 мкМ) оказалось явно недостаточной для токсического воздействия на клетку. В тоже время, теоретически вычисленная концентрация OA внутри клетки (около 200 мкМ) оказалась достаточно высокой чтобы привести к некрозу клетки. Для проверки этой гипотезы, мы использовали $\Delta ACP1$ мутант дрожжевой митохондриальной FAS-II, вовлечённой в синтез OA. Примечательно, что делеция гена $ACP1$ не повлияла на содержание OA в среде. OA является предшественником липоевой кислоты, обладающей антиоксидантными свойствами. Однако штаммы с делецией генами биосинтеза липоевой кислоты из OA не показали увеличения уровня ROS и SICD.

Мы делаем вывод что OA, синтезированная в митохондриальной FAS-II системе не вовлечена в SICD в дрожжах *S. cerevisiae*. Также, мы пришли к выводу, что митохондрии вообще никак не задействованы в SICD в экспоненциально растущих дрожжах.

Анализ состава и молекулярного профиля мембранных липидов *Phaeotremella foliacea* в условиях дефицита фосфора

Амигуд Е.Я.^{1,2}, Сеник С.В.², Серебряков Е.Б.³, Котлова Е.Р.²

¹ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

³ Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» СПбГУ, Санкт-Петербург
ekamigud@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38678

Ключевые слова: липидомика, базидиомицеты, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, стерины, бетаиновые липиды.

Липиды – это разнообразная по строению и функциям группа химических веществ. Известно, что помимо мембранообразующей функции, они участвуют в сигналинге, апоптозе, транспорте и т.д. Структурное разнообразие липидов достигается большим количеством молекулярных видов – комбинаций полярных групп, цепей жирных кислот и остова молекулы. Именно такое множество форм и затрудняет их изучение.

Все структурное разнообразие липидов, встречающееся в клетке, называют липидомом. Изучением липидома и его метаболизма занимается липидомика, с применением масс-спектрометрии как основного метода.

Данное исследование было направлено на изучение структурного разнообразия мембранных липидов таких классов, как фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламины (ФЭ), бетаиновые липиды диацилглицеринтриметилгомосерины (ДГТС) и стерины. ФХ и ФЭ относятся к фосфоглицеролипидам, имеют глицерин в качестве остова, две цепи жирных кислот и полярную группу, которая присоединяется через фосфорную кислоту – холин у ФХ и этаноламин у ФЭ. ФХ и ФЭ – одни из самых распространенных мембранных фосфолипидов в грибной клетке. ФХ составляет до 50% всех фосфолипидов, ФЭ – 20–50%.

ДГТС относится к бетаиновым липидам и не имеет в составе фосфора, а также содержит триметиламмонийную группу в полярной части молекулы. ДГТС встречается у многих групп простейших, фотосинтезирующих бактерий и водорослей, грибов и споровых растений. У одних видов он синтезируется конститутивно, у других – только в условиях дефицита фосфора. Вероятно, ДГТС является эволюционным предшественником ФХ (Dembitsky, 1996).

ФХ, ФЭ и ДГТС имеют множество молекулярных видов, различающиеся составом жирных кислот: количеством С-атомов в цепи, наличием и положением двойных связей.

Еще одним классом мембранных липидов являются стерины – важные компоненты мембраны, влияющие на ее текучесть и проницаемость.

Липидом базидиальных грибов – широкая и малоизученная тема. В зависимости от формы роста (дрожжевой или мицелиальной), состав и метаболизм липидов может иметь свои особенности. В отличие от аскомицетов, среди базидиомицетов нечасто встречается дрожжевая форма, поэтому их липидомика представляет собой актуальную тему для исследования.

Объектом для данной работы был взят штамм базидиальных дрожжей *Phaeotremella foliacea* (Pers.) LE-BIN 4616 из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

С целью изучения структурного разнообразия и метаболизма мембранных липидов, штамм выращивали на полной агаризированной питательной среде на основе солодового экстракта и, для активации биосинтеза бетаиновых липидов, в условиях дефицита фосфора. Культуры выращивали в темноте при 25 °C в течение 10 суток.

Липиды экстрагировали в хлороформе с метанолом (1:2) с последующей промывкой 1% раствором NaCl по методу Bligh and Dyer (1959). Разделение на классы фосфолипидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии по Bening et al. (1995). Профили молекулярных видов глицеролипидов определяли методом жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии в режиме MRM на масс-спектрометре с тройным квадрупольем Shimadzu LCMS-8030. Исследование проводилось с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества». Состав стеринов определяли методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на Agilent 7820A с масс-детектором MSD 5975 после силилирования с BSTFA.

Анализ липидома *P. foliacea* методами масс-спектрометрии позволил выявить 18 молекулярных видов ФХ и 13 видов ФЭ, этифицированных жирными кислотами C14–C24 ряда. Во всех условиях в составе ФХ доминировали 16:0/18:2, 16:0/18:1, 18:1/18:2 и 18:1/18:1 молекулярные виды. Профиль ФЭ отличался большим количеством пальмитиновой (16:0) кислоты. Интересно, что профиль фосфолипидов *P. foliacea* значительно отличается по составу молекулярных видов от базидиальных грибов с мицелиальной формой роста, которые представлены преимущественно 18:2/18:2, в меньшей степени 18:1/18:2 и 18:2/18:3 молекулярными видами (Kotlova et al., 2022).

При дефиците фосфора также наблюдалось увеличение средней длины ацильных цепей фосфолипидов: уменьшение количества 16/18 молекулярных видов, увеличение 18/18.

ДГТС присутствовал только в культурах, которые росли в условиях дефицита фосфора, и был представлен 19 молекулярными видами, основные из которых 16:0/18:1 и 16:0/18:2, однако также встречались 18:2/18:2, 18:1/18:2 и 18:1/18:1.

В профиле стеринов выявлен эргостерин, 9(11)-дегидроэргостерин, эргоста-7,22-диен, фунгистерин и эбурикол.

Таким образом, в условиях дефицита фосфора мембранные фосфолипиды *P. foliacea* (преимущественно содержащие C16-жирные кислоты) замещаются бетаиновыми липидами ДГТС, состоящими, в основном, из 16:0/18:1 и 16:0/18:2 мол. видов. По всей видимости, 16:0/18:1 и 16:0/18:2 диацилглицериды, освобождающиеся при гидролизе фосфолипидов, используются для биосинтеза ДГТС.

Данная работа расширяет представления о структурном разнообразии мембранных липидов дрожжей и дает материал для будущих исследований метаболизма глицеролипидов в сравнении с другими группами организмов.

Протеазная активность *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

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

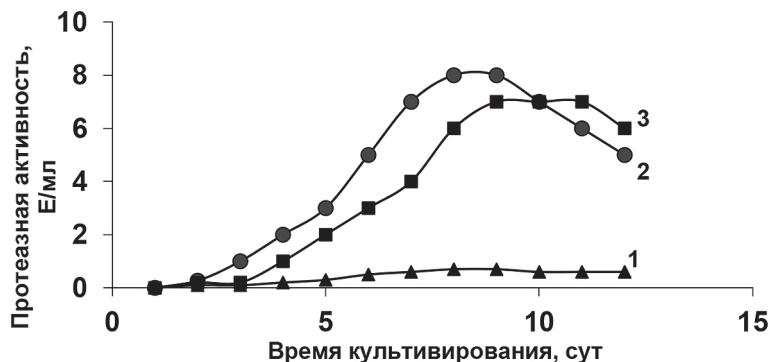
DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38679

Ключевые слова: внеклеточная протеаза, активность, свойства.

Почвенные грибы рода *Trichoderma* широко используются в качестве биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений, которые вызываются фитопатогенными грибами *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Botrytis cinerea* and *Fusarium* spp. Контроль за численностью патогенов грибами *Trichoderma* обусловлен их способностью к образованию антибиотических соединений (антибиозис) и комплекса липидических ферментов (тускораситизм).

В настоящем исследовании показана индукция синтеза внеклеточной протеазы у грибов *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D. При выращивании гриба на среде Чапека с добавлением пшеничных отрубей или дезактивированного мицелия гриба *Fusarium decemcellulare* BKMF 1179 (максимум накопления протеазной активности обнаруживалась на 10 и 7 сутки культивирования) (рис. 1). При росте гриба на глюкозе протеазная активность была относительно низкая.

Рис. Протеазная активность *Trichoderma cf. aureoviride* при росте на глюкозе (1), пшеничных отрубях (2) или дезактивированном мицелии гриба *Fusarium decemcellulare* BKMF 1179 (3)



Протеаза была очищена с применением ионообменной хроматографии на колонке с DEAE ToyoPearl 650 M (Япония) (табл. 1). Молекулярная масса белка, определенная методом гель-фильтрации на сепа-криле S-200 (Эндрюс, 1969) составляла 26 000–30 000 кД (n = 3 – количество определений).

Таблица 1

Схема очистки протеазы из *Trichoderma cf. aureoviride*

Стадия	Объем, мл	Общая активность, Е/мл	Белок, мг	Удельная активность Е/мг белка	Степень очистки
Культуральная жидкость	150	24.0	80	0.3	
Концентрат PM-10	120	21	7	1.8	6
Осаждение этанолом (50%)	3.0	18	5	3.6	12
DEAE ToyoPearl	11.0	11	1.2	9	30

Влияние pH и температуры

Влияние pH на активность протеазы при гидролизе азоказеина было проверено в диапазоне значений pH от 4.0 до 10.0. Максимальная активность отмечалась при значении pH, равном 8,0.

Фермент проявлял активность в диапазоне температур от 5 до 45 °C, при этом максимальная активность проявлялась при температуре 35 °C, при температуре 45 °C относительная активность составляла ~50% от максимальной.

Очищенную протеазу тестировали на ее активность в присутствие различных ингибиторов. Активность фермента была полностью ингибирована ПМСФ, что указывает на принадлежность фермента к классу сериновых протеаз (табл. 2).

Таблица 2

Влияние ингибиторов на активность протеазы из *Trichoderma cf. aureoviride*

Ингибитор	Концентрация, мМ	Ингибирование, %
ПМСФ(PMSF)	1.0	35±2
	5.0	80±5
	10.0	100
p-ХМБ	0.5	55±4
	2.0	80±5
	5.0	100
1,10 – Фенантролин	0.5	45±3
	2.0	75±5
	5.0	100

Было установлено, что протеаза, выделенная из среды роста *T. aureoviride* Rifai BKMF-4268D, ингибирует рост фитопатогенных грибов (*Fusarium decemcellulare* BKM F-1169, *Rhizoctonia solani* BKM F-895), а также Грамм-положительных и Грамм-отрицательных бактерий. Это предполагает непосредственное участие протеазы в биоконтроле. Помимо снижения активности фитопатогенов, протеазы могут быть вовлечены в конкуренцию за белковые субстраты, а также в микопаразитарный процесс путем разрушения белковых компонентов клеточной стенки фитопатогенов.

Литература

1. Szekeres A., Kredics L., Antal Z. et al. (2004) Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett. 233, 215–222.
2. Uchikoba T., Mase T., Arima K. et al (2001) Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. Biol. Chem. 382, 1509–1513.
3. Wang Y., Zhu X., Wang J. et al. (Basel). 2023 Identification of Mycoparasitism-Related Genes against the Phytopathogen *Botrytis cinerea* via Transcriptome Analysis of *Trichoderma harzianum* T4. Fungi Mar 6;9(3):324. doi: 10.3390/jof9030324.
4. Abbas A., Mubeen M., Zheng H., Sohail M.A.L. et al. Front Microbiol. 2022. *Trichoderma* spp. Genes Involved in the Biocontrol Activity Against *Rhizoctonia solani*. May 25;13:884469. doi: 10.3389/fmicb.2022.884469.

Кинетика восстановления метакрилата RMrd *Geobacter sulfurreducens*

Архипова О.В.¹, Таухутдинова С.Р.¹, Микулинская Г.В.²,
Абашина Т.Н.¹, Захарова М.В.¹

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
aroksan@gmail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38680

Ключевые слова: рекомбинантная метакрилатредуктаза, *Geobacter sulfurreducens* AM-1, анаэробное дыхание, K_m , V_{max} .

Среди терминальных дыхательных редокс систем, восстанавливающих ненасыщенные органические соединения, особого внимания заслуживают периплазматические флавинсодержащие ферментные системы анаэробных грамотрицательных бактерий. Такие ферментные системы обнаружены у *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Delta proteobacteria*), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1^T (класс *Delta proteobacteria*), *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809^T (класс *Desferribacteres*), *Wolinella succinogenes* DSM 1740^T (класс *Epsilon proteobacteria*) и представителей рода *Shewanella* (класс *Gammaproteobacteria*) [1]. Они обладают разной субстратной специфичностью, восстанавливая фумарат, метакрилат (2-метилпропеноат, неприродное токсичное соединение) и уроканат. Мономерные дыхательные фумаратредуктазы *Shewanella* и двухкомпонентные метакрилатные редокс системы *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans*, *D. acetiphilus* и *W. succinogenes* являются флавоцитохромами с. Физиологическая роль этих флавоцитохромов с, вероятно, не только катализическая, но и электронтранспортная. Они, по всей видимости, являются периплазматическими хабами, осуществляя перенос электронов между цитоплазматической и внешней мембранными [1, 2].

Метакрилатная редокс система *G. sulfurreducens* AM-1 включает FAD-содержащую 50 кДа метакрилатредуктазу Mrd и мультигемовый 30 кДа цитохром с Mcc, гены которых организованы в один оперон [3]. Mcc служит физиологическим донором электронов для Mrd [1, 3]. Ранее были осуществлены клонирование и гетерологичная экспрессия *mrd* в аэробнорастущих клетках *E. coli*, очистка рекомбинантного белка RMrd и его характеристика физическими методами [4]. Целью работы стало изучение кинетических характеристик восстановления метакрилата рекомбинантным ферментом RMrd.

Рекомбинантная метакрилатредуктаза RMrd из клеток *E. coli* была очищена до электрофоретической гомогенности. Для измерения метакрилатвосстанавливающей активности в реакционной смеси необходимо присутствие Mcc. Поэтому природный Mcc из клеток *G. sulfurreducens* AM-1 был также получен в чистом виде, что было подтверждено электрофорезом.

Было показано, что метакрилатредуктазная активность RMrd зависела как от концентрации RMrd, так и от концентрации Mcc. Максимальная скорость восстановления метакрилата для RMrd наблюдалась, когда в реакционной смеси концентрация Mcc была в 1.5–2 раза больше, чем таковая RMrd. Для установления кинетических параметров в реакционной смеси присутствовали 0.16 μM RMrd и 0.32 μM Mcc, количество метакрилата в реакционной смеси варьировалось. Метакрилатвосстанавливающая активность, определенная при возрастающих концентрациях метакрилата в реакционной смеси, следовала типичной кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 1). Кажущаяся K_m составила 0.36 mM (рис. 2). Это в 4.5 раза больше, чем кажущаяся K_m к метакрилату у природной Mrd [5]. Кажущаяся V_{max} восстановления метакрилата рекомбинантным белком составила 0.18 μM/мин на 1 мг белка.

Полученные результаты представляют интерес для изучения механизма катализа системой «Mrd+Mcc», понимания физиологической роли метакрилатной редокс системы, а также для биотехнологического использования этих белков.

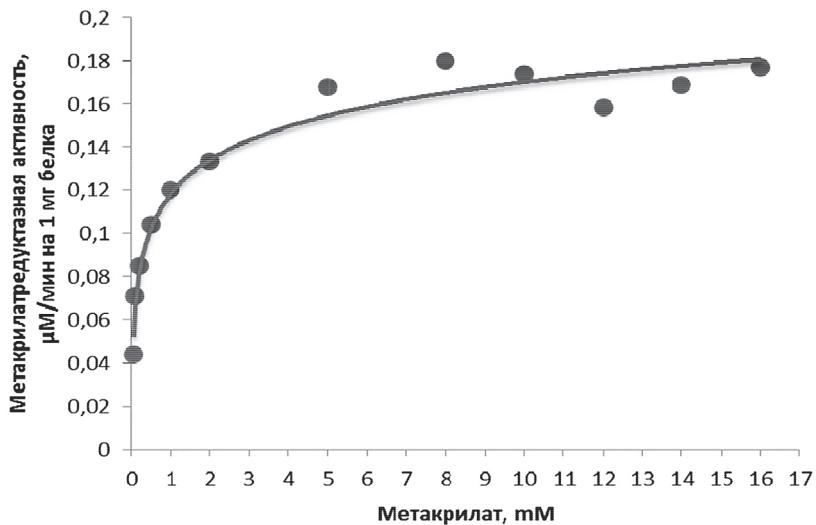


Рис. 1. Зависимость метакрилатредуктазной активности RMrd от концентрации метакрилата

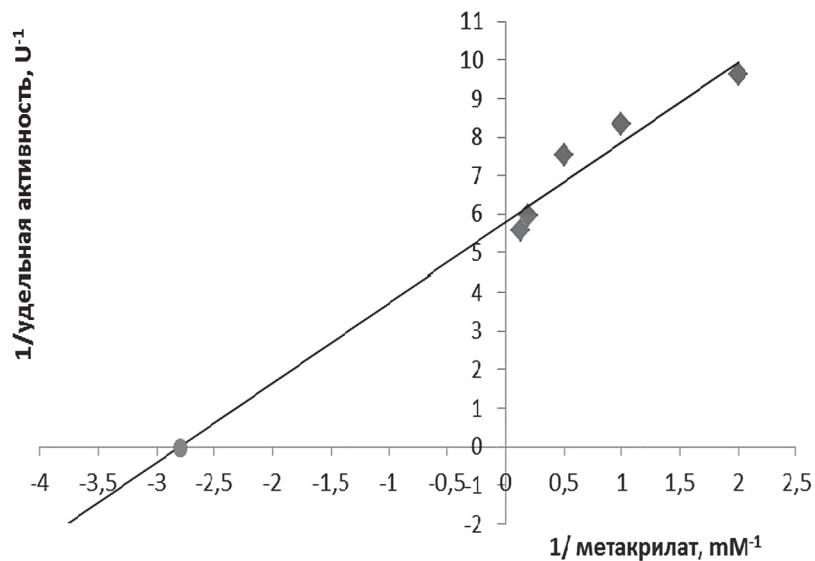


Рис. 2. Определение K_m к метакрилату и V_{max} восстановления метакрилата RMrd

Литература

- Архипова О.В. Метакрилатные редокс системы анаэробных бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 6. С. 551–563.
- Kees E.D., Pendleton A.R., Paquete C.M., Arriola M.B., Kane A.L., Kotloski N.J., Intile P.J., Gralnicka J.A. Secreted flavin cofactors for anaerobic respiration of fumarate and urocanate by *Shewanella oneidensis*: cost and role // Applied and Environmental Microbiology. 2019. V. 85. № 16. doi: 10.1128/AEM.00852-19
- Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. Recent origin of the methacrylate redox system in *Geobacter sulfurreducens* AM-1 through horizontal gene transfer // PLoS ONE. 2015. 10(5): e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
- Архипова О.В., Таухутдинова С.Р., Ашин В.В., Захарова М.В., Микулинская Г.В., Молочков Н.В., Кутышенко В.П., Прохоров Д.А. Характеристика рекомбинантной метакрилатредуктазы RMrd *Geobacter sulfurreducens* AM-1 // VII Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосфера роль микроорганизмов». 6–9 декабря 2021. Пущино. С.123–124. ISBN 978-5-89118-845-7. DOI: 10.34756/GEOS.2021.17.37942.
- Mikoulinskaia O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R.K., Hedderich R. Cytochrome c-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1 // Eur.J. Biochem. 1999. V. 263. P. 346–352.

Бактериофаг *Lysobacter guttmosus* 3.2.11

Афошин А.С., Тарлачков С.В., Кудрякова И.В., Сузина Н.Е.,
Леонтьевская Е.А., Леонтьевская Н.В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
alex080686@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38681

Ключевые слова: *Lysobacter*, бактериофаг T4, антимикробные препараты, биотехнология бактериолитических ферментов

Бактерии рода *Lysobacter* – грамотрицательные бактерии палочковидной формы, распространенные в водной и почвенной среде. Как правило, представители данного рода отличаются способностью к секреции множества антимикробных соединений, так как пептиды, антибиотики и бактериолитические ферменты. В лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН изучаются бактерии-продуценты антимикробных соединений (*L. capsici*, *L. enzymogenes*, *L. antibioticus*, *L. guttmosus*) с целью поиска бактериолитических ферментов, которые могут быть использованы в качестве антимикробных лекарственных средств нового поколения. Для получения бактериолитических ферментов в биотехнологически значимом масштабе была разработана гомологичная система экспрессии. Эта система может быть значительно оптимизирована за счет использования промоторов бактериофагов, способных лизировать клетки *Lysobacter*. Однако о бактериофагах *Lysobacter* информация к моменту начала работы отсутствовала. Таким образом, целью данной работы было выделить бактериофаг *L. capsici* и *L. guttmosus* и частично охарактеризовать его.

Для выделения бактериофагов было отобрано 5 л воды из р. Оки. Проба воды была сконцентрирована в 100 раз и использована для совместного культивирования с *L. capsici* XL1, *L. capsici* BKM-2533^T, *L. guttmosus* 3.2.11. После 18 ч культивирования клетки фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Фильтрат смешивали с клетками-мишенями и вносили в агаризованную среду. Через 48 ч проводили подсчет бляшкообразующих единиц (БОЕ). БОЕ формировались только для штамма *L. guttmosus* 3.2.11. Для селекции бактериофагов было проведено не менее четырех пассажей. Очистка частиц бактериофага проводилась с использованием дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы. Очищенные частицы бактериофагов были использованы для электронной микроскопии и выделения ДНК.

Согласно данным секвенирования генома и электронной микроскопии выделенный бактериофаг *L. guttmosus* 3.2.11 относится к T4-подобным бактериофагам. Размер генома составил 169 795 п.о., 56% GC, предсказано 290 белок-кодирующих генов. Геном выделенного бактериофага идентичен на 88,5% геному бактериофага DLP_6 *Stenotrophomonas maltophilia*.

Полученные данные о геноме бактериофага *L. guttmosus* 3.2.11 могут быть использованы как для создания вирусного вектора, так и для поиска эффективных регуляторных элементов, необходимых для создания экспрессионных систем бактериолитических ферментов *Lysobacter*.

Авторы благодарят А.А. Зимина за консультации и обсуждение полученных результатов.

Выбор тест культур для определения механизма действия модифицированных алкил-нуклеозидов, перспективных антисептиков для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галерее

**Бенько Е.А.^{1,2}, Авданина Д.А.², Ермолюк А.А.², Калинин С.Г.²,
Макаров Д.А.³, Александрова Л.А.³, Жгун А.А.²**

¹ Московский политехнический университет, г. Москва
elizavetabenko8@gmail.com

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва

³ ИМБ РАН, г. Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38682

Ключевые слова: биопоражение объектов культурного наследия, грибы-деструкторы, алкил-нуклеозиды, клик-химия, механизм действия антибиотиков

Микроорганизмы являются одной из основных причин, приводящих к разрушению объектов культурного наследия, в том числе произведений живописи. В связи с этим имеется несколько стратегий, направленных как на предотвращение биопоражения, так и на борьбу с микроорганизмами-деструкторами соответствующих материалов. При этом важнейшие процедуры связаны с консервацией (соблюдение температурно-влажностных условий хранения и другие нормативы) и реставрацией (включающей физическое или/ и химическое воздействия). Один из наиболее эффективных способов защиты связан с применением антисептиков. Существует множество соединений различных классов, применяемых для защиты объектов культурного наследия, однако количество антисептиков, применяемых в живописи, крайне ограничено и значительно сократилось в последние годы. Многие антисептики исключили из рекомендуемой палитры, поскольку могли вступать во взаимодействие с живописными материалами или были токсичны для реставраторов и посетителей музеев. Такие повышенные требования к антисептикам для живописи привели к тому за последние годы на рынок не вышли новые препараты. Наиболее применяемый Катамин АБ (бензалкония хлорид) не охватывает полностью весь спектр микроорганизмов-деструкторов живописных материалов. Кроме того, повсеместное применение приводит к возникновению резистентности у микроорганизмов против этого антисептика. В результате в настоящее время возникла инновационная брешь в разработке антисептиков нового поколения. В связи с этим актуальной задачей является получение соединений широкого спектра действия, способных эффективно защищать произведения от микробиологического поражения в составе живописных материалов, не воздействовать на физико-химические свойства материалов и нетоксичных для людей.

Ранее мы охарактеризовали микробиологическое разнообразие в залах древнерусской живописи основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский переулок, 10, Москва) [1]. В составе микробиома этого музея обнаружили около 700-т последовательностей бактерий и 300-т последовательностей микроскопических грибов. После изучения энзиматической активности микроорганизмов на макетах с отдельными лакокрасочными материалами, изготовленных в отделе научной реставрации темперной живописи Третьяковской галереи, определили доминантные микроорганизмы-деструкторы, потенциально опасные для хранящихся произведений. Ими оказались плесневые грибы, в том числе, ксерофилы [1]. Выделенные в чистые линии культуры этих грибов-деструкторов использовали в серии экспериментов по подбору таргетированных антисептиков. Одними из изучаемых соединений были представители нового класса антибиотиков, алкил-нуклеозидов, для которых в настоящее время не известен механизм действия [2–4]. Оказалось, что наиболее активны C12-алкильные производные N⁴-алкил-5-метилцитидинов [2]. Этую активность можно несколько усилить, заменяя гидроксильную группу в 3'-положении дезоксирибозы на аминогруппу или метил-(диметил-)аминогруппы [3]. Однако

целый ряд других модификаций боковых радикалов молекулы приводят к практически полной потери антимикозной активности [5]. В частности, перемещение длинной (С10-12) алкильной группы из 4-го в 5-ое положение уридуина делает соединение неактивным в отношении грибов, но сохраняет активность против бактерий [4]. Наиболее активные алкилнуклеозиды использовали для приготовления макетов с живописными материалами. Предварительные данные показывают, что эти соединения являются перспективными антисептиками, поскольку не влияют на спектральные и поверхностные свойства материалов, а также, более эффективно работают в составе живописных материалов по сравнению с применяемыми стандартными антисептиками.

Несмотря на многочисленные эксперименты, на бактериях, грибах и культурах клеток млекопитающих, демонстрирующих эффективную работу изучаемых алкил-нуклеозидов, в настоящее время не известен их механизм действия. Один из подходов для поиска мишени связан с определением клеточного компартмента, в котором происходит взаимодействие соединения. С этой целью решили использовать клик-химическую реакцию между соединениями, содержащими азидную и этиновую группы. Одна из этих групп должна присутствовать в составе алкилнуклеозида, другая содержится в составе коммерческого флуоресцентного красителя. Поскольку, у изученных алкил-нуклеозидов не было таких групп, для эксперимента синтезировали модифицированные соединения ALA-108 (с азидной группой, введенной вместо гидроксильного остатка в 5'-положении рибозы) и ALA-122 (с ацетиленовой группой в 5 положении N⁴-алкилцитидина).

Поскольку любые модификации могут значительно воздействовать на активность алкил-нуклеозидов, целью нашей работы было характеристика антимикозных свойств новых соединений ALA-108 (N⁴-додецил-5-метил-5'-азидо-5'-дезоксицитидин) и ALA-122 (N⁴-додецил-5-этинил-2'-дезоксицитидин) и выбор тест-культур для локализации воздействия в клетке методом клик-химии. Для этого использовали 12 штаммов грибов-деструкторов темперных материалов (из семейств *Aspergillaceae*, *Cladosporiaceae*, *Pleosporaceae*, *Cordycipitaceae* и *Microascaceae*), ранее изолированных в Третьяковской галерее: *Aspergillus versicolor* STG-25G (MK260015.1), *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 (MW590700.1), *Cladosporium halotolerans* STG-52B (MK258720.1), *Aspergillus creber* STG-57 (MK266993.1), *Aspergillus versicolor* STG-86 (MK262781.1), *Aspergillus creber* STG-93W (MW575292.1), *Cladosporium parahalotolerans* STG-93B (MK262909.1), *Simplicillium lamellicola* STG-96 (MK262921.1), *Microascus paisii* STG-103 (MW591474.1), *Aspergillus protuberus* STG-106 (MK268342.2) и *Penicillium chrysogenum* STG-117 (MW556011.1), *Aspergillus niger* STG-143B (MK271273.1) [1].

В качестве внутреннего контроля использовали ранее охарактеризованные алкил-нуклеотиды, с высокой антимикозной активностью, такие как N⁴-додецил-5-метил-2'-дезоксицитидин (ALA-54) и N⁴-додецил-5-метил-3'-амино-2',3'-дидезоксицитидин (SOV4) [2, 3]. Также использовали стандартные антисептики, Катамин АБ и пентохлорфенолят натрия. Уровень ингибиции изучали на агаризованной среде Чапека-Докса (CDA; г/л: сахароза – 30, NaNO₃ – 2, K₂HPO₄ – 1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄ · 7H₂O – 0.01, агар – 20, pH 7.0–7.4) по отношению радиального роста грибных колоний с добавлением 0.2 mM соединений (алкилнуклеозидов или стандартных антисептиков) к росту на контрольной среде (без добавок). Исследование проводили при 26 °C в течение 47 сут после инокуляции тест-культур на опытные и контрольные агаризованные среды, измерения проводили каждые 3 дня. Оказалось, что введение как азидной, так и этиновой группы в соответствующие положения N⁴-додецил-нуклеозида не приводят к полной потере антимикозной активности соединений. ALA-108 и ALA-122 ингибируют радиальный рост мицелия большинства тест культур, однако сила воздействия на некоторые тест-культуры падает, в 2–5 раз. Наиболее подходящими (обладающими наибольшей активностью, близкой к немодифицированным для клик-химической реакции алкил-нуклеотидам) для экспериментов с ALA-108 оказались культуры *Ulocladium* sp. AAZ-2020a, STG-36 *C. halotolerans* STG-52B, *M. paisii* STG-103, *A. protuberus* STG-106 и *P. chrysogenum* STG-117. Соединение ALA-122 проявило наибольшую активность в отношении *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36, *C. halotolerans* STG-52B, *P. chrysogenum* STG-117 и *A. niger* STG-143B. Причем для обоих изучаемых соединений лучшая активность проявлялась в отношении *P. chrysogenum* STG-117.

Таким образом, в нашей работе показано, что принципиально возможно получать активные в отношении плесневых грибов производные алкил-нуклеозидов с модификациями для использования в клик-химических реакциях. Определенные чувствительные штаммы будут использованы на следующем этапе работы для определения локализации ALA-108 и ALA-122 в грибных клетках после клик-химических

реакций с коммерческими флуоресцентными красителями, несущими этиновую и азидную группы соответственно.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00106.

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 N⁴-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // Eur. J. Med. Chem. 2021. Vol. 215.
3. Alexandrova L.A. et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides // New J. Chem. The Royal Society of Chemistry, 2022. Vol. 46, № 12. P. 5614–5626.
4. Makarov D.A. et al. 5-Substituted Uridines with Activity against Gram-Positive Bacteria // ChemMedChem. John Wiley & Sons, Ltd, 2023. P. e202300366.
5. Alexandrova L.A.. et al. Patent RU 2766333C1. New N4-modified 5-methyl-2'-deoxycytidines exhibiting antimicotic activity. 2022.

Анализ динамики SICD в штаммах *S. cerevisiae* с делетированными генами, вовлечёнными в некоторые ключевые метаболические процессы

Валиахметов А.Я.

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38683

Ключевые слова: дрожжи, SICD, ROS, NRS, мембранный потенциал, клеточный цикл.

Показано, что в штаммах ΔAFO1, ΔPOX1 и ΔYNO1 у которых нарушены механизмы генерации ROS в таких органеллах как митохондрии, пероксисома и ЭР, наблюдается значимое снижение количества клеток с избытком ROS (на 25%, 29% и 35% соответственно). Однако это снижение не сопровождается значимым снижением числа клеток с SICD. GME в отличии от L-NAME показал значимое подавление генерации ROS и SICD. Однако эндогенные антиоксиданты TSA1 и YDR034W-B не оказали значимого эффекта на изучаемые процессы. Снижение количества клеток с ROS и SICD в штаммах ΔTRK1 и ΔTRK2 показало частичную зависимость SICD от ΔΨ, но не подтвердило ключевую роль ΔTRK2 в подавлении SICD, как было показано на стационарных клетках. Потенциал-зависимые транспортные системы PM AGP1, GAP1, PHO84 оказались не вовлечены в регуляцию SICD. Таким образом, критическая зависимость SICD от ΔΨ пока остается необъяснённой. Проверенные гены, экспрессирующиеся в S-phase клеточного цикла, также оказались неэффективными в подавлении SICD. Штаммы ΔVSB1 и ΔYPR003C, с нарушениями (предположительно) в метаболизме серы показали значимое снижение числа клеток с избытком ROS и с SICD. Полученные результаты подтверждают, взаимозависимость, хотя и не жёсткую, между накоплением ROS и развитием SICD. Во всех протестированных штаммах нейтральный pH и 150 mM KCl снижали количество клеток с избытком ROS и с SICD в той же степени, что и на родительском штамме BY4742.

Поиск грибных целлобиозодегидрогеназ класса III

Горина С.Ю., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
sofygorina.1991@mail.ru; mpkolomytseva@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38684

Ключевые слова: целлобиозодегидрогеназы, CDH класса III, аскомицеты, грибы.

Целлобиозодегидрогеназы (CDH, EC1.1.99.18) – внеклеточные ферменты целлюлолитического ферментного комплекса грибов, участвуют в разложении древесины, окисляя целлобиозу и олигосахариды до δ -лактонов (Ayers et al., 1978). CDH осуществляют последовательный перенос электрона от молекулы сахара через дегидрогеназный домен (DH) к цитохромсвязывающему гемсодержащему домену (CYT), который в свою очередь способен отдавать электрон другому ферменту целлюлолитического ферментного комплекса – литической полисахаридмонооксигеназе (LPMO) с последующим восстановлением иона меди активного центра LPMO (Wood et al., 1992; Zámocký et al., 2006; Csarman et al., 2020). Благодаря своим свойствам, CDH может быть использована в качестве универсального биодетекторного элемента, в анодах ферментативных биотопливных элементов и биосуперконденсаторах (Scheiblbrandner et al., 2020), а также в гидролизе биомассы, биоремедиации, переработке целлюлозы и бумаги, биотрансформации и биосинтезе ценных соединений, в качестве антибактериального покрытия медицинских изделий и материалов (Csarman et al., 2020; Scheiblbrandner et al., 2020).

В настоящее время выделяют четыре класса CDH: I, II, III и IV (Csarman et al., 2020; Scheiblbrandner et al., 2020). Однако получены в чистом виде и охарактеризованы только CDH классов I и II. CDH класса III является теоретически выделенной в ходе предварительного филогенетического анализа группой целлобиозодегидрогеназ. Их исследования показывают, что CDH класса III должны иметь отличия в области субстрат связывающего активного центра, результатом которых может быть изменение функциональной активности ферментов, потенциально позволяющее существенно расширить границы их применения вплоть до создания принципиально новых «зеленых» технологий.

В ходе настоящей работы был оптимизирован метод идентификации CDH-активности грибов на основе образования Берлинской Лазури (Prussian Blue – PB) в результате каталитической реакции, осуществляемой CDH при твердофазном культивировании грибов. С помощью этого метода удалось отобрать перспективные культуры-продуценты CDH родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, геномы которых предположительно содержат гены CDH класса III и изучить физиологию продукции CDH. На основе модифицированной PB-реакции в жидкой среде удалось исследовать динамику CDH-активности отобранных грибных культур и субстратной избирательности продуцируемых CDH. Анализ геномов грибов, близких к отобранным аскомицетам, показал наличие множества CDH-генов у каждого гриба. А исследование субстратной избирательности продуцируемых отобранными грибами CDH подтвердило способность этих грибов продуцировать множественные формы CDH, избирательные в отношении к разным, в том числе новым субстратам.

Также, в ходе работы на основе анализа грибных геномов и поиска в них генов, кодирующих CDH-подобные белки, филогенетического анализа, масштабного скрининга грибов из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН), предположительно содержащих в своем геноме CDHIII-гены, удалось разработать подход для специфичной идентификации генов CDH класса III и экспериментально показать с помощью разработанного подхода их наличие у отобранных грибных культур родов *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*.

Исследования поддержаны грантом РФФИ-АНФа № 21-54-14009 и Фондом поддержки молодых ученых имени Геннадия Комиссарова.

Литература

1. Ayers A.R. et al. // European Journal of Biochemistry. 1978. V. 90. P. 171–181.
 2. Wood J.D. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1119. P. 90–96.
 3. Zámocký M. et al. // Curr. Protein Pept. Sci. 2006. V. 7. P. 255–280.
 4. Csarman F. et al. // The Enzymes. 2020. V. 47. P. 457–489.
 5. Scheiblbrandner S. et al. // Bioelectrochemistry. 2020. V. 131. P. 107345.
-

Продукция сероводорода у бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* при добавлении внеклеточного цистина

Егорова В.В.¹, Ушаков В.Ю.^{1,2}, Смирнова Г.В.², Октябрьский О.Н.²

¹Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН
ushakovvad@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38685

Ключевые слова: H₂S, цистин, богатая и минимальная питательная среда.

При выращивании бактерий в лабораторных условиях цистеин (как и его окисленная форма – цистин) либо транспортируется из богатой питательной среды, либо синтезируется *de novo* из сульфата на глюкозо-минеральной среде. Резкое повышение концентрации внеклеточного цистина сопровождается ростом концентрации цистеина в цитоплазме. Известно, что повышенные концентрации внутриклеточного цистеина являются токсичными, поскольку могут потенцировать реакцию Фентона через восстановление Fe³⁺ до Fe²⁺ [1]. Образующий гидроксильный радикал может повреждать все важнейшие биомолекулы (ДНК, белки и мембранны). Вследствие этого бактерии должны строго контролировать уровень свободного внутриклеточного цистеина.

Показано, что у грамотрицательных бактерий *E.coli* десульфурирование цистеина до H₂S является одним из способов снижения его внутриклеточной концентрации до безопасного уровня, при этом динамика процесса зависит от состава среды культивирования [2, 3].

Цель данной работы: исследовать продукцию H₂S при резком повышении концентрации внеклеточного цистина у грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium*, растущих на минимальной среде M9 и богатой среде LB.

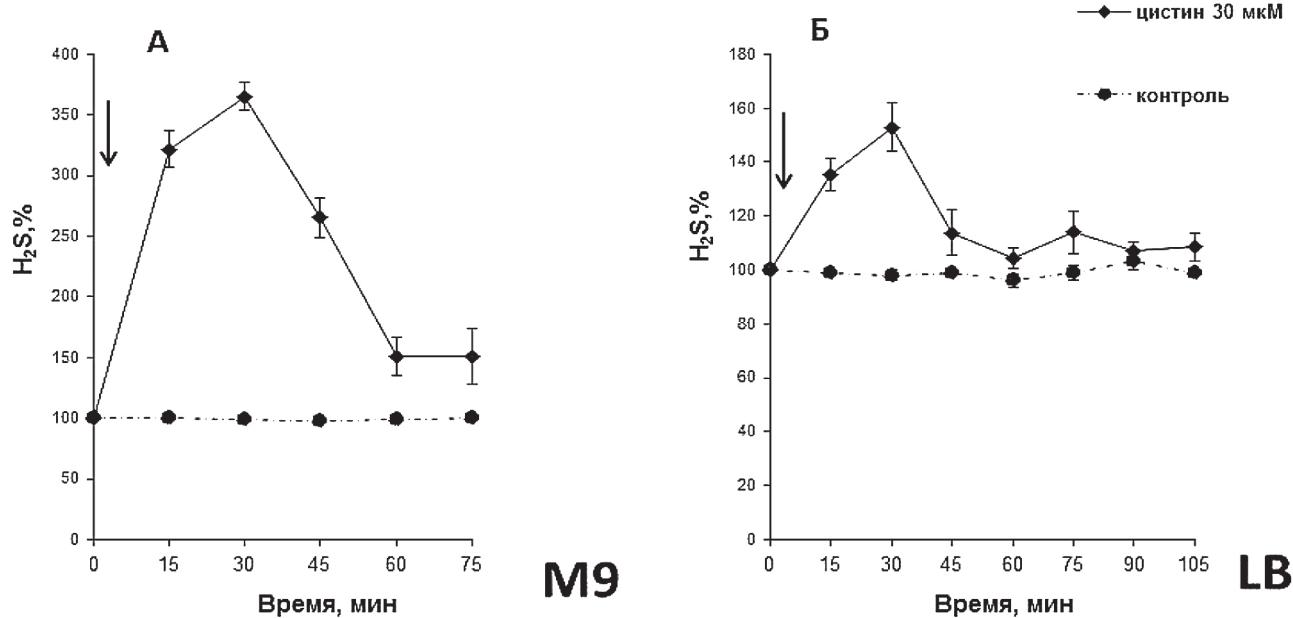
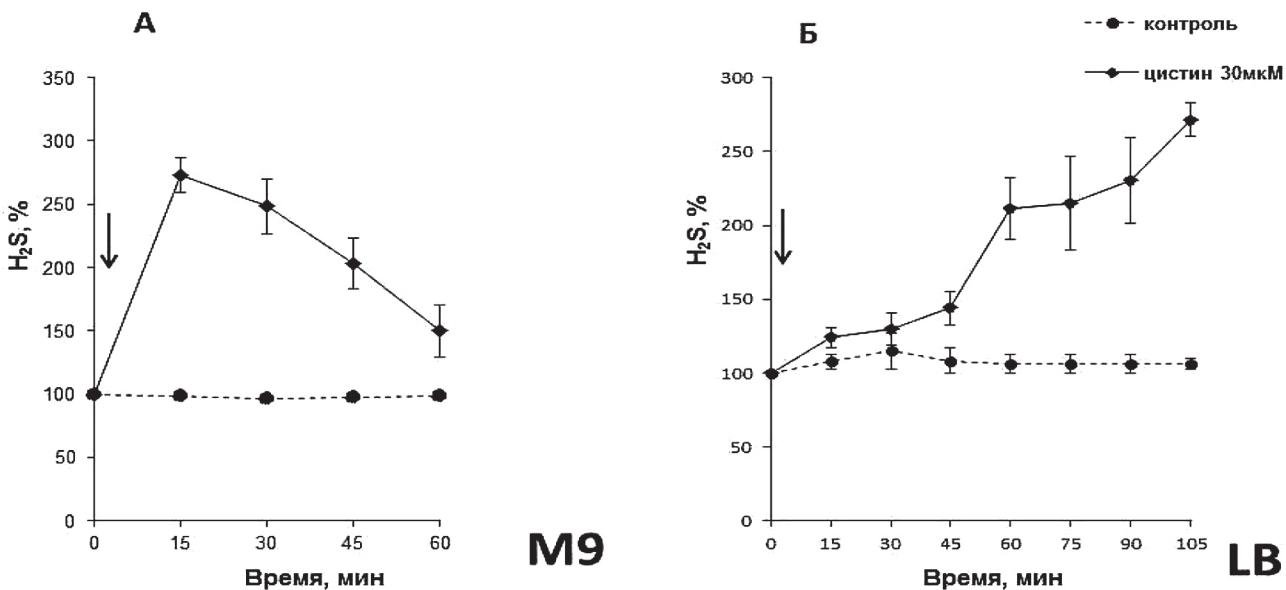
Исследуемые штаммы *B. subtilis* VKM428 и *B. megaterium* VKM 512 (Всероссийская коллекция микроорганизмов) культивировались в орбитальном шейкере при 37 °C и 110 об/мин в среде M9 + глюкоза (1%) или богатой среде LB (Sigma). Детекцию газообразной формы сульфида водорода проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой с помощью бумажных полосок, пропитанных ацетатом свинца как описано у Shatalin et al. [4]. Количественно изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ, интенсивность выражали в процентах.

Внесение цистина к растущим клеткам *B. subtilis* приводило к снижению удельной скорости роста на 30% как на среде M9, так и на среде LB. Подобного эффекта в экспериментах с *B. megaterium* не регистрировалось (не показано).

Добавление цистина к *B. subtilis* и *B. megaterium*, растущим на среде M9 и LB, стимулировало производство H₂S. Кинетика накопления сероводорода на среде M9 у обоих видов носила двухфазный характер. В этих условиях, максимальные уровни внеклеточного H₂S были близки и достигались у *B. subtilis* через 15 мин, а у *B. megaterium* – через 30 мин после добавления цистина (рис.1A,2A). Значительные различия в кинетике накопления H₂S между двумя видами бактерий наблюдались при росте на среде LB.

У *B. megaterium* продукция H₂S начиналась сразу после добавления цистина, проходила в две фазы и общее количество внеклеточного H₂S было значительно меньше, чем у *B. subtilis*. У *B. subtilis* быстрое накопление H₂S начиналось только через 45 мин после добавления цистина. *B. megaterium*, растущие на LB, накапливали H₂S значительно меньше, чем эти бактерии, растущие на среде M9 (рис. 1Б, 2Б). Результаты свидетельствуют о том, что продукция H₂S при добавлении цистина в растущие культуры *B. subtilis* и *B. megaterium* в значительной мере зависит как от состава инкубационной среды, так и от вида бактерий. Одной из причин наблюдаемых различий является наличие цистина в среде LB, тогда как бактерии, растущие на среде M9, синтезируют цистеин (цистин) посредством восстановления сульфата.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта РНФ № 22-14-00093.



Литература

1. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. // *J. Bacteriol.* – 2003 – V.185 – P. 1942–1950.
2. 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.
3. Smirnova G., Tyulenev A., Muzyka N., Ushakov V., Samoylova Z., Oktyabrsky O. Influence of Growth Medium Composition on Physiological Responses of *Escherichia coli* to the Action of Chloramphenicol and Ciprofloxacin // *BioTech* – 2023 – V. 12(43) – P. 43.
4. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria // *Science.* – 2011. – V. 334. – P. 986–990.

Моноклональное антитело HlyIC-15 обеспечивает защиту участка узнаваемого тромбином от его протеолитического действия

Замятин А.В.², Нагель А.С.¹, Караповская А.П.², Руденко Н.В.², Сиунов А.В.¹,
Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Серегина Е.А.³, Сиротенко В.С.⁴,
Кучерявенко А.Ф.⁴, Спасов А.А.⁴, Бровко Ф.А.², Солонин А.С.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина)

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

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»
Министерства здравоохранения

⁴ Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38686

Ключевые слова: тромбозы, мышь, тромботические агенты, артерии.

Среди панели моноклональных антител к С-концевому участку гемлизина II (HlyICTD) *Bacillus cereus* обнаружено моноклональное антитело (МА) HlyIC-15, способное образовывать иммунный комплекс с областью узнавания тромбином [1]. Показана возможность HlyC-15 узнавать пептидные фрагменты, полученных в результате гидролиза пептидной связи, что указывает на участие во взаимодействии линкерных участков, расположенных перед сайтом узнавания тромбином и после него. Таким образом, эпигоп моноклонального антитела HlyIC-15 включает не только сайт узнавания тромбином, но и дополнительные аминокислотные остатки flankирующие сайт узнавания. Анализ возможности атаки на сайт узнаваемый тромбином, предварительно обработанным этим МА в экспериментах *in vitro* продемонстрировал эффективную защиту сайта узнавания от протеолитического гидролиза пептидной связи в участке узнавания. Анализ действия МА HlyIC-15 в кровяном русле показал, что скорость роста кровяного сгустка уменьшается. Время активированного частичного тромбопластинования и протромбиновое время удлинились при добавлении МА HlyIC-15. При оценке влияния препарата МА HlyIC-15 на пространственную динамику свертывания крови [3], вызванную повреждением стенки артерий введением тромботических агентов (тромбин-индуцированный тромбоз сосудов легких) при однократном внутривенном введении не установлена способность предотвращать гибель животных в эксперименте. Однако, данные морфологического исследования легких мышей при однократном внутривенном введении МА HlyIC-15 подтверждают его способность предотвращать возникновение артериальных тромбозов. Наибольшую эффективность препарат МА HlyIC-15 к тромбину проявил в

минимальной исследованной дозе – 50 мг/кг, в более высоких дозах наблюдалось снижение эффекта, что может быть связано с увеличением токсичности вещества при повышении доз. Эффективность для моноклональных антител описана именно в низких дозах, что также согласуется с полученными данными. Медицинская практика последних месяцев показала, что при инфекции COVID-19 у пациентов в тяжелой форме наблюдается образование странных тромбов в крови [2]. У ряда больных отмечались признаки сгущения крови и образования тромбов в разных органах. Нейрохирурги отмечают резкий всплеск инсультов из-за тромбов, а патологоанатомы наблюдали при вскрытии легкие, наполненные сотнями микротромбов. В связи с этим использование MA HlyII-15, может оказаться удачным инструментом в изучении и понимании процессов свертывания крови в ходе инфекции COVID-19.

Литература

1. Замятина А.В., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Шепеляковская А.О., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Салямов В.И., Колесников А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С. Моноклональное антитело HLYII15 против С-концевого домена HlyII B. cereus взаимодействует с сайтом узнавания тромбином. Биоорганическая химия, 2020, Т. 46, № 6, С. 753–760.
2. Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J., Liu X.H., Zhu C.L. // Clin. Chem. Lab. Med. 2020. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0188/cclm-2020-0188.xml. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0188>
3. Furie B., Furie B.C. Thrombus formation in a living mouse. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006;35(1-2):1-4. doi: 10.1159/000093534. PMID: 16855338.

Флавивирусы ракообразных, *Cragon cragon* и *Gammarus chevreuxi*, проявляют большое сходство при эволюционном сравнении последовательностей их полигенов методом наибольшей экономии

Зимин А.А.¹, Никулина А.Н.¹, Никулин Н.А.¹, Шорохова А.П.¹, Присяжная Н.В.¹,
Назипова Н.Н.², Дроздов А.Л.³, Киселев С.С.⁴, Осепчук Д.В.^{5,6}, Кощаев А.Г.⁶

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

² Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики
им. М.В. Келдыша РАН, Пущино

³ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

⁴ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пущино

⁵ ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», Краснодар

⁶ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина», Краснодар
zimin@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38687

Ключевые слова: флавивирусы ракообразных, обыкновенная или бурая креветка, *Cragon cragon*, *Gammarus chevreuxi*.

В недавнем нашем эволюционном исследовании полигена флавивируса ракообразного *Cragon cragon* [1] не были учтены находки флавивирусов ракообразных последних лет. Это в первую очередь флавивирус гамаруса, *Gammarus chevreuxi* (*Malacostraca; Amphipoda*) (GcFV), и другие флавивирусы ракообразных [2, 3]. Для того, чтобы учесть все имеющиеся последовательности полигенов флавивирусов ракообразных, близких к CcFV, мы провели поиск новых последовательностей, обладающих высоким сходством с полигеном этого вируса на 24.10.2023 в БД NCBI Genbank. 31 последовательность найден-

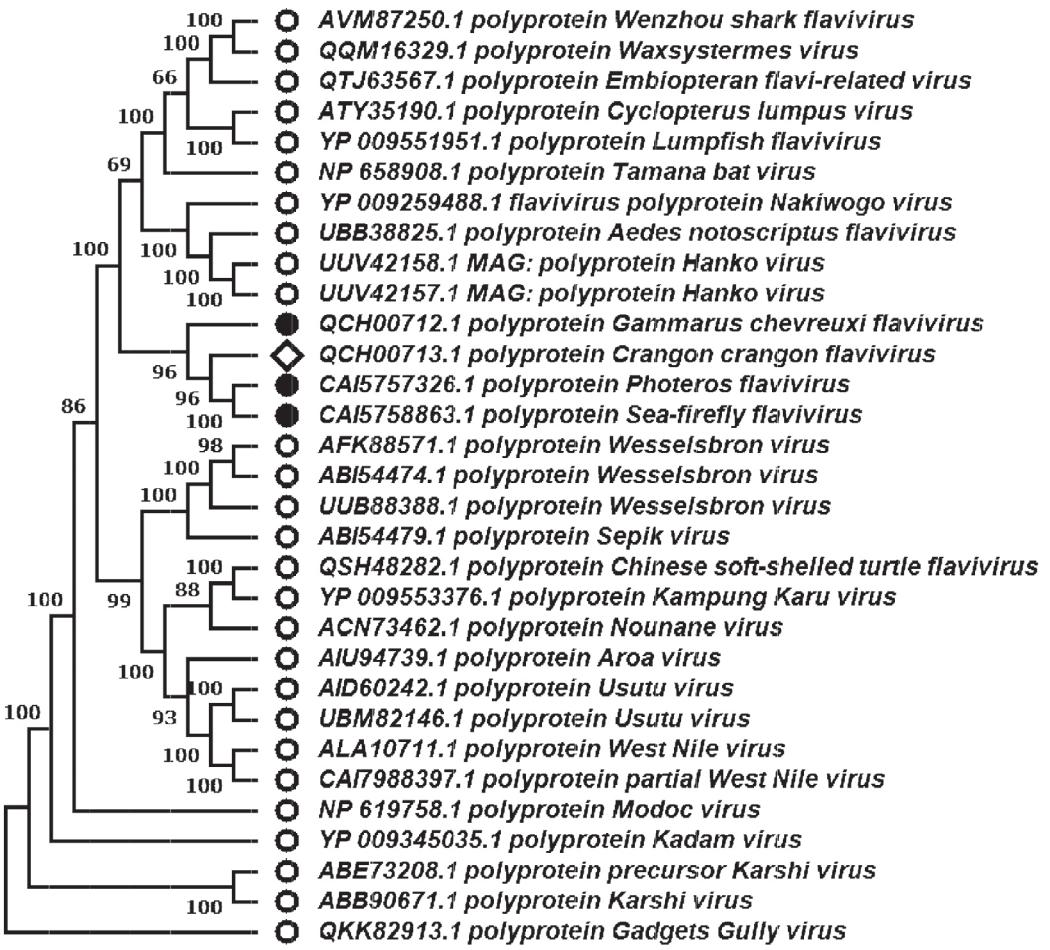


Рис. 1. Филогенетический анализ полипротеина flavivирусов (объяснения к рисунку в тексте тезисов)

ных полипротеинов использовали для эволюционного анализа методом максимальной экономии в пакете MEGA X [4]. На рис. 1 приведено самое экономное дерево длиной = 14057. Рядом с ветвями показан процент повторных деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (1000 повторов). Дерево MP было получено с использованием алгоритма Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) с уровнем поиска 1, в котором исходные деревья были получены путем случайного добавления последовательностей (10 повторов). Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были исключены. Всего в окончательном наборе данных было 1611 позиций. Flavivirus обыкновенной креветки обозначен белым ромбом, наиболее близкие к нему последовательности вирусов рыб и вируса гамаруса черными кружками, остальные flavivирусы белыми кружками.

В данной работе с помощью сравнительного анализа полипротеинов методом максимальной экономии было выявлено, что вирус гамаруса GcFV оказался наиболее близким к вирусу обыкновенной креветки. Ранее нами было показано, что CcFV располагается на отдельной ветви. Все новые последовательности, включенные нами в этот анализ, оказались наиболее близкими к flavivирусу обыкновенной креветки *Crangon crangon*. Это были также две аминокислотные последовательности полипротеинов flavivирусов морских рыб. Следовательно, распространение flavivирусов среди многоклеточных животных происходит скорее под влиянием экологических факторов, чем эволюционного родства хозяев. С точки зрения санитарии креветочной аквакультуры Черного моря и черноморского побережья эта эволюционная близость данных вирусов заставляет задуматься о возможном заносе flavivирусов данной группы и из солоноводных озер региона Северного Кавказа. Исходя из этого, необходима разработка новых тест-систем на основе ПЦР с учетом сходства разных областей полипротеина, характерных для данных flavivирусов ракообразных.

Литература

1. Зимин А.А., Никулина А.Н., Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.В., Назипова Н.Н., Дроздов А.Л., Осепчук Д.В., Кощаев А.Г. Эволюционные связи вируса креветки обыкновенной (*Cragon cragon FLAVIVIRUS, CCFV*) среди близкородственных *Flaviviridae*, выявленные на основе филогенетического анализа полибелка методом наибольшей экономии // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. 2023. Т. 12. № 1. С. 203–208. doi: 10.48612/sbornik-2023-1-48.
2. Parry R., Asgari S. Discovery of novel crustacean and cephalopod flaviviruses: insights into the evolution and circulation of flaviviruses between marine invertebrate and vertebrate hosts // J. Virol. 2019. V. 93. Article № e00432-19. doi: 10.1128/JVI.00432-19.
3. Dong X., Wang G., Hu T., Li J., Li C., Cao Z., Shi M., Wang Y., Zou P., Song J., Gao W., Meng F., Yang G., Tang K.F.J., Li C., Shi W., Huang J. A novel virus of *Flaviviridae* associated with sexual precocity in *Macrobrachium rosenbergii* // mSystems. 2021. V. 6. Article № e0000321. doi: 10.1128/mSystems.00003-21.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

DELTA-BLAST как средство для эвристических находок сходств полибелка flavивируса IPV *Macrobrachium rosenbergii*

Зимин А.А.¹, Никулина А.Н.¹, Никулин Н.А.¹, Шорохова А.П.¹,
Присяжная Н.В.¹, Назипова Н.Н.², Дроздов А.Л.³, Киселев С.С.⁴,
Осепчук Д.В.^{5,6}, Кощаев А.Г.⁶

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

² Институт математических проблем биологии РАН –
филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Пущино

³ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

⁴ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пущино

⁵ ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», Краснодар

⁶ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина», Краснодар
zimin@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38688

Ключевые слова: flavивирусы ракообразных, *Macrobrachium rosenbergii*.

Мы зачастую используем DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) в тех случаях, когда алгоритмы PSI-BLAST, blastp, и уж тем более Quick BLASTP не дают никаких результатов поиска в БД аминокислотных последовательностей, а PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) не можем применить, так как по той или иной причине нам не известны консервативные патерны, либо когда последовательность настолько нова для БД, что консервативные патерны ещё не определены.

В этой работе мы попытались использовать DELTA-BLAST для исследования хорошо изученных последовательностей полибелков flavивирусов ракообразных с надеждой получить новые, альтернативные сведения об эволюции данной группы вирусов. В результате поиска с помощью DELTA-BLAST по *Flaviviridae* (taxid:11050) БД Genbank с параметрами по умолчанию мы получили следующие 16 верхних находок.

Приводим таксономию для обнаруженных последовательностей.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Flaviviridae	viruses		19	
• unclassified Flaviviridae	viruses		7	
• • Macrobrachium flavivirus 1	viruses	7259	6	Macrobrachium flavivirus 1 hits
• • Atrato Flavi-like virus 2	viruses	153	1	Atrato Flavi-like virus 2 hits
• Modoc virus	viruses	158	4	Modoc virus hits
• Jutiapa virus	viruses	162	2	Jutiapa virus hits
• Mpulungu flavivirus	viruses	159	1	Mpulungu flavivirus hits
• dengue virus type 1	viruses	156	2	dengue virus type 1 hits
• Apoi virus	viruses	150	1	Apoi virus hits
• Montana myotis leukoencephalitis virus	viruses	150	1	Montana myotis leukoencephalitis virus hits
• Zika virus	viruses	149	1	Zika virus hits

Обычно используемое нами средство, PSI-BLAST, при аналогичном запросе выдало следующую таксономию 16 верхних находок.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Flaviviridae	viruses		21	
• unclassified Flaviviridae	viruses		16	
• • Macrobrachium flavivirus 1	viruses	7715	6	Macrobrachium flavivirus 1 hits
• • Yanggou tick virus	viruses	163	6	Yanggou tick virus hits
• • Ailanthus flavi-like virus	viruses	162	1	Ailanthus flavi-like virus hits
• • Flaviviridae sp.	viruses	159	1	Flaviviridae sp. hits
• • Hainan jingmen-like virus	viruses	157	1	Hainan jingmen-like virus hits
• • Guangxi tick virus	viruses	157	1	Guangxi tick virus hits
• Tamana bat virus	viruses	166	5	Tamana bat virus hits

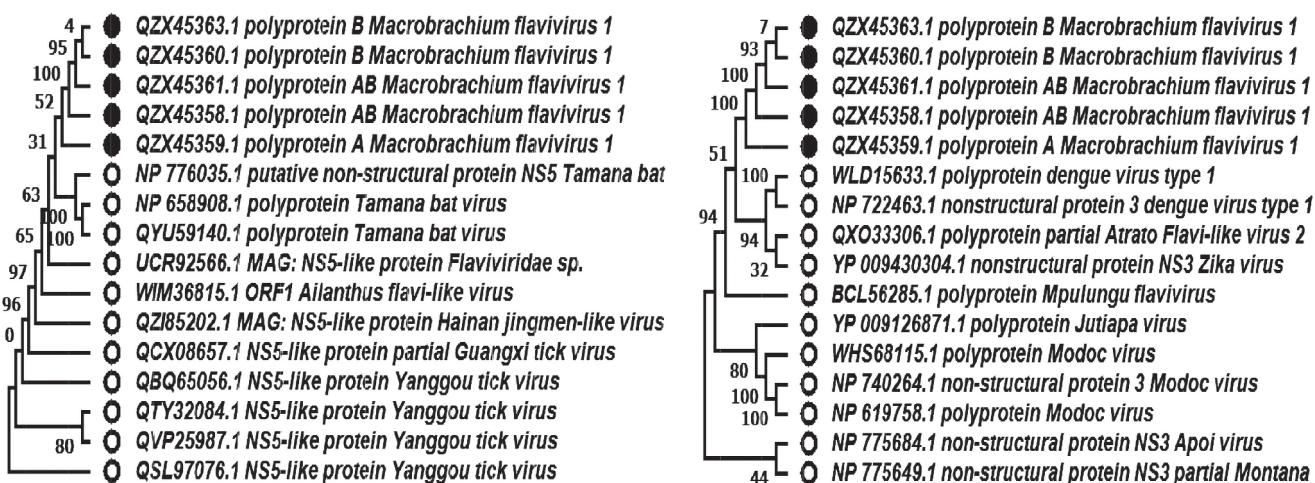


Рис. 1. Филогенетический анализ полибелка flavивирусов (объяснения к рисунку в тексте тезисов)

Отдельный анализ филогении для двух выявленных наборов с построением деревьев на основе выравниваний в MUSCLE с применением метода Maximum Parsimony (рис. 1) достаточно ясно показал, что последовательности, найденные с помощью DELTA-BLAST, дают топологию дерева, характерную для эволюции дальнеродственных белков, а полибелки, обнаруженные после одной итерации PSI-BLAST (blastp) на дереве выглядят как весьма сходные представители одной ветви.

Macrobrachium rosenbergii широко выращивается в мире как объект пресноводной или солоноводной аквакультуры, включая УЗДН-производство. Возможно, использование DELTA-BLAST для анализа сходств в области NS3 полибелка flavivирусов может быть использовано для нахождения новых консервативных патернов в аминокислотной, а на этой основе и в нуклеотидной последовательности для конструирования новых диагностических ДНК-тестов, учитывая существенные экономические потери из-за инфекции IPV и родственными ему вирусами.

Литература

1. Зимин А.А., Никулина А.Н., Никулин Н.А., Шорохова А.П., Присяжная Н.В., Назипова Н.Н., Дроздов А.Л., Оценчук Д.В., Кощаев А.Г. Эволюционные связи вируса креветки обыкновенной (*Cragon cragon flavivirus, CCFV*) среди близкородственных *Flaviviridae*, выявленные на основе филогенетического анализа полибелка методом наибольшей экономии // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. 2023. Т. 12. № 1. С. 203-208. doi: 10.48612/sbornik-2023-1-48.
2. Dong X., Wang G., Hu T., Li J., Li C., Cao Z., Shi M., Wang Y., Zou P., Song J., Gao W., Meng F., Yang G., Tang K.F.J., Li C., Shi W., Huang J. A novel virus of *Flaviviridae* associated with sexual precocity in *Macrobrachium rosenbergii* // mSystems. 2021. V. 6. Article № e0000321. doi: 10.1128/mSystems.00003-21.

Геномная и физиологическая характеристики штамма *Pseudomonas* sp. OVF7, разлагающего углеводороды и образующего биопленки при культивировании на нафталине и *n*-додекане

Иванова А.А.¹, Сазонова О.И.¹, Звонарев А.Н.¹, Делеган Я.А.¹,
Богун А.Г.¹, Стрелецкий Р.А.², Ветрова А.А.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
mrs.ivanova.a.a@gmail.com

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
(Лаборатория экологического почвоведения факультета почвоведения)

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38689

Ключевые слова: *Pseudomonas*, геном, нафталин, *n*-алканы, биодеградация, биопленки.

Бактерии рода *Pseudomonas* благодаря своей метаболической универсальности способны использовать различные токсические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии, также они могут продуцировать биологически активные вещества, способствующие усвоению этих соединений. Деградация углеводородов нефти часто требует микробной адаптации к загрязнителю, что является важной стратегией повышения стрессоустойчивости и толерантности микробных клеток. Одним из примеров микробной адаптации к экстремальным условиям окружающей среды является образование биопленок.

Целью настоящего исследования являлось изучение геномных и адаптационных особенностей штамма *Pseudomonas* sp. OVF7, а также его физиологических характеристик при культивировании на нафталине, *n*-додекане и их смеси.

Штамм *Pseudomonas* sp. OVF7 был выделен из нефтезагрязненных почв Пограничного нефтяного месторождения, Сургутский район Ханты-Мансийского автономного округа. Он утилизирует *n*-алканы, нафталин, сырую нефть и дизельное топливо при температуре 28 °С. Геномную ДНК штамма OVF7 секвенировали с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore. После сборки кольцевой хромосомы было установлено, что размер генома OVF7 составляет 7174 т.п.н., содержание GC – 60,35%. Плазмидных ДНК обнаружено не было. С помощью программного обеспечения Prokka в хромосоме *Pseudomonas* sp. OVF7 было аннотировано 6 628 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 6 генов рРНК и 62 гена тРНК. На основании анализа гена 16S рРНК исследуемый штамм был предварительно отнесен к роду *Pseudomonas*, а именно к группе флуоресцирующих псевдомонад. Для определения точной видовой принадлежности штамма *Pseudomonas* sp. OVF7 были рассчитаны индексы средней идентичности нуклеотидов (ANI) и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) между штаммом OVF7 и идентифицированными до вида типовыми штаммами группы флуоресцирующих псевдомонад, чьи геномы имеются в базах данных NCBI, BV-BRS, TYG и *Pseudomonas.com*. Показатели ANI и dDDH составили 84,44–88,87% и 36,6–59,1% соответственно; эти значения ниже критерия для отнесения штамма к известному виду. Филогенетическое дерево, построенное на основе гена *rpoD*, также не позволило определить видовую принадлежность штамма. Вероятно, *Pseudomonas* sp. OVF7 относится к новому виду группы флуоресцирующих псевдомонад.

Анализ полногеномной последовательности штамма OVF7 показал, что его хромосома содержит все гены, необходимые для превращения *n*-алканов в производные ацил-КоА (*alk*-гены), а также гены, участвующие в деградации нафталина через салицилат и катехол (*nah* и *sal*-гены). Обнаруженные генетические системы имеют организацию характерную для оперонов деградации *n*-алканов, нафталина и салицилата у псевдомонад. Взаимное расположение генов деградации *n*-алканов и нафталина в хромосоме штамма OVF7 таково, что *nah*-гены расположены ниже *sal*-генов, в то время как *alk*-гены расположены выше генов *sal* на расстоянии около 7 т.п.н.

Метаболические возможности штамма OVF7 и его физиологические характеристики изучались при культивировании в жидкой минеральной среде при 28 °С с нафталином, *n*-додеканом и в смеси нафталин/*n*-додекан. Кривая роста штамма OVF7 на *n*-додекане характеризовалась длительной фазой адаптации, в отличие от кривых роста на нафталине и смеси нафталин/*n*-додекан. Это свидетельствует о разной токсичности и биодоступности для микроорганизмов разных классов углеводородов. В середине фазы экспоненциального роста при выращивании штамма OVF7 как на нафталине, так и на смеси нафталин/*n*-додекан наблюдалось небольшое плато, которое характерно для момента накопления салицилата. Смесь углеводородов оказывала токсическое действие на бактериальную культуру в первые часы культивирования, что проявлялось в снижении численности микроорганизмов. А после адаптационного периода характер кривой роста на смеси субстратов был максимально приближен к кривой роста штамма в среде, содержащей только нафталин. Кроме того, при выращивании в жидкой минеральной среде с добавлением смеси нафталин/*n*-додекан штамм потреблял субстраты последовательно: сначала нафталин, а затем *n*-додекан.

Одним из вариантов адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды является формирование биопленок. Способность штамма *Pseudomonas* sp. OVF7 образовывать биопленки при росте на различных субстратах изучали методами фазово-контрастной, флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии. При культивировании в жидкой минеральной среде с сукцинатом (в качестве контроля) бактериальные клетки выстраивались рядом, образуя плотный однородный слой. В том случае если в качестве ростового субстрата использовали нафталин, то OVF7 образовывал биопленку с перфорированной системой микроканалов. Биопленка имела пористую губчатую структуру, когда штамм *Pseudomonas* sp. OVF7 находился в жидкой минеральной среде, содержащей смесь субстратов (нафталин и *n*-додекан). Биопленка с плотным слоем бактериальных клеток формировалась при выращивании штамма на *n*-додекане. Методом флуоресцентной микроскопии было установлено, что биопленки были образованы живыми клетками. Формирование биопленок с разной архитектурой при выращивании штамма *Pseudomonas* sp. OVF7 на разных субстратах демонстрирует адаптивные возможности микроорганизма при росте в различных условиях окружающей среды.

Влияние ципрофлоксацина на уровень и редокс-статус железа в среде и в клетках *Escherichia coli* в отсутствие и в присутствие цистина

Калашникова Т.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь
tatyana-kalashnikova22@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38690

Ключевые слова: ионы железа, цистин, сероводород, ципрофлоксацин, *E. coli*.

Железо является одним из необходимых элементов для жизнедеятельности бактериальных клеток. Оно входит в состав многих ферментов, в том числе компонентов дыхательной цепи, транскрипционных регуляторов и сенсорных систем. Однако в то же время повышение уровня свободного Fe^{2+} представляет потенциальную опасность из-за его способности вступать в реакцию Фентона между H_2O_2 и Fe^{2+} , с образованием чрезвычайно токсичного гидроксильного радикала. Реакция может активироваться цистеином путем восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} . Было показано, что повреждение ДНК с участием $\text{OH}\cdot$ является основной причиной гибели клеток при пероксидном стрессе. Поэтому уровень ионов железа в клетке строго контролируется с участием Fur-белка, который в комплексе с Fe^{2+} репрессирует транспорт железа из среды. Концепция, разрабатываемая группой Коллинза и их последователями, предполагает, что действие бактерицидных антибиотиков, включая хинолоны, приводит к токсическим изменениям метаболизма, которые сопровождаются увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), способствующих летальности антибиотиков [1]. Было показано, что сероводород может защищать бактерии от бактерицидных антибиотиков и окислительного стресса, предположительно, за счет связывания свободного железа с образованием нерастворимого FeS и предотвращения реакции Фентона [2]. Известно также, что снабжение бактерий цистином сопровождается повышением уровня цистеина и продукцией H_2S [3]. Целью данной работы было изучить изменения уровня и редокс-статуса железа в среде и клетках при действии ципрофлоксацина в присутствии и в отсутствие цистина.

Объектом исследований служил родительский штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio. Перенос слияния *iucC::lacZ* из штамма BN407 в BW25113 осуществляли методом трансдукции с фагом P1. Бактерии выращивали на минимальной среде M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 15.13 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, NaCl – 0.5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 0.246 г/л, CaCl_2 – 0.011 г/л) с глюкозой (0.2%). Ночную культуру разбавляли в 100 мл среды до начальной OD_{600} около 0.05 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37 °C, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили 100 мкМ FeSO_4 и ципрофлоксацин (ЦФ) в концентрациях 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл и продолжали инкубацию в течение двух часов. В экспериментах с цистином осуществлялось его дробное добавление по 15 мкМ каждые 45 минут в течение всего опыта. Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по уравнению $\mu = \Delta \ln \text{OD}_{600}/\Delta t$, где t – время в часах. Концентрацию Fe^{2+} и Fe^{3+} в среде определяли феррозиновым методом. Изменения уровня внутриклеточного Fe^{2+} оценивали по степени экспрессии Fur-контролируемого гена *iucC*, определяя активность β-галактозидазы в штамме, несущем слияние *iucC::lacZ*. Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя стандартную ошибку и доверительный интервал. Достоверность различий оценивали согласно *t*-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0.05$.

При росте в среде M9 без добавок клетки *E. coli* потребляли приблизительно 1 мкМ железа. Добавление в среду цистина и обработка клеток 0.03 мкг/мл ЦФ не влияли на данный процесс, тогда как дозы 0.3 и 3 мкг/мл ЦФ снижали потребление железа в среднем в 2 раза. В присутствии 100 мкМ FeSO_4 дозы 0.03 и 0.3 мкг/мл ЦФ не влияли на уровень общего железа в среде, а доза 3 мкг/мл снижала этот уровень. Предположительно, такой эффект был результатом связывания Fe с H_2S , который продуцируется в ответ на обработку клеток высокой дозой ЦФ. Присутствие цистина в среде также несколько снижало уровень общего железа, вероятнее всего по той же причине, поскольку цистин стимулирует продукцию

H_2S . Уровень Fe^{2+} в среде не изменялся при обработке культуры 0.03 и 0.3 мкг/мл ЦФ. Доза 3 мкг/мл ЦФ увеличивала концентрацию двухвалентного железа в среде, что может быть следствием выхода Fe^{2+} из клеток, поскольку при этой дозе антибиотика наблюдается снижение удельной скорости роста культуры до отрицательных значений, что свидетельствует о частичном лизисе клеток. В присутствии цистина концентрация Fe^{2+} снижалась при всех дозах ципрофлоксацина. Добавление 100 мкМ FeSO_4 сопровождалось его быстрым окислением до Fe^{3+} , однако через 1 час, когда в среде создаются микроаэробные условия, начиналось обратное восстановление и рост концентрации Fe^{2+} , при этом данный процесс ингибировался при действии 0.3 и 3 мкг/мл ЦФ независимо от присутствия цистина.

В среде без добавления FeSO_4 экспрессия слияния *iucC::lacZ* повышалась по мере роста *E. coli*, что указывает на дефицит внутриклеточного Fe^{2+} . Добавление 100 мкМ FeSO_4 ингибировало повышение экспрессии *iucC::lacZ*. Ингибирующий эффект оказывало и присутствие цистина, который, с одной стороны, замедляет рост и, соответственно, потребление Fe, а с другой – превращаясь в цистein, восстанавливает Fe^{3+} до Fe^{2+} , что также репрессирует ген *iucC*. Добавление ципрофлоксацина снижало экспрессию *iucC::lacZ*, что косвенно свидетельствует о повышении Fe^{2+} в цитоплазме. Однако обработка клеток 3 мкг/мл ЦФ вызывала повышение экспрессии *iucC*, которое было менее выражено в присутствии цистина, что указывает на снижение уровня Fe^{2+} в цитоплазме, вероятно, за счет его выхода в среду.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что ципрофлоксацин влияет на уровень общего железа и Fe^{2+} в среде и внутри клеток. Характер этого влияния зависит от концентрации ЦФ и присутствия цистина в среде. Можно предположить, что наблюдаемые изменения уровня и редокс-статуса железа будут вносить определенный вклад в бактерицидную активность антибиотика.

Исследование выполнено в соответствии с государственным заданием AAAA-A19-119112290009-1 и при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Литература

1. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. – 2007. – V. 130. – P. 797–810.
2. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H_2S : A universal defense against antibiotics in bacteria // Science. – 2011. – V. 334. – P. 986–990.
3. Imlay K.R.C., Korshunov S., Imlay J.A. The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2015. – V. 197. – P. 3629–3644.

Роль полиолов и растворимых сахаров в мицелии грибов вида *Aspergillus tubingensis* в устойчивости к высоким дозам ионизирующего облучения

Крючкова М.О.^{1,2} Иванова А.Е.^{2,3}, Данилова О.А.⁴, Терешина В.М.⁴

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

³ ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, Москва

⁴ ИНМИ им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
margo_kruchkova@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38691

Ключевые слова: полиолы, растворимые сахара, *Aspergillus tubingensis*, ионизирующее облучение, устойчивость.

Aspergillus tubingensis Mosseray 1934 – это широко распространенный вид секции *Nigri*, вызывающий порчу продуктов питания, микозы, выделяющий микотоксины и разлагающий полиуретаны (Silva et al., 2020; Khan et al., 2017).

Источники ионизирующего излучения бывают природного и антропогенного характера. Различные виды излучений встречаются и в космическом пространстве. При длительном (миллионы лет) экспонировании в таких условиях живые организмы получают высокие накопительные дозы облучения (сотни кГр). Воздействие ионизирующими излучениями вызывает в клетке окислительный стресс – избыток активных форм кислорода (супероксид O_2^- , перекись водорода H_2O_2 , гидроксильный радикал $HO\cdot$ и др.), повреждающих белки, нуклеиновые кислоты и клеточные мембранны (Storz, Imlayt 1999).

Антиоксидантная защита у микроорганизмов включает ферментативную и неферментативную системы, которые либо обезвреживают активные формы кислорода, либо устраняют вызванные ими повреждения (Abrashev et al., 2008). Ферментные системы включают супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионредуктазу и несколько пероксидаз. Неферментативные системы представлены витаминами С и Е, глутатионом и низкомолекулярными антиоксидантами (трегалоза, гликоген) (Ruijter et al., 2003).

В конидиях *Aspergillus niger* (вид, относящийся к секции *Nigri*, морфологически неотличим от *Aspergillus tubingensis*) преобладающее углерод содержащее вещество – D-маннит (10–15% сухого веса). Его физиологическая функция не только источник резервного углерода, но и антиоксидантная защита. Высокая концентрация маннита в спорах играет роль выживания спор (Ruijter et al., 2003).

Объектами данного исследования были штаммы *Aspergillus tubingensis*, выделенные из необлученных и облученных γ -лучами (0,1 и 1 МГр) образцов пустынных почв. В необлученных образцах данный вид был минорным компонентом сообщества, а в облученных – доминировал. Определяли состав сахаров и полиолов в мицелии.

В мицелии всех штаммов среди растворимых сахаров и полиолов преобладал маннит (8–9% от сухого веса). По-видимому, высокое содержание маннита связано с возможной ролью этого полиола как энергетического источника для поддержания метаболизма растущего мицелия и как протекторного вещества при недостатке влаги и засухе. Что вероятно способствует выживанию и возможности развития этих штаммов в пустынных местообитаниях.

Содержание трегалозы было весьма незначительным (меньше процента от сухой массы). *A. tubingensis* относится к мезофильным грибам, вероятно, механизм обеспечения устойчивости штаммов за счет повышения уровня содержания трегалозы в мицелии для исследованных штаммов не актуален. И основную роль в поддержании жизнеспособности данных конкретных штаммов при облучении играют другие биохимические особенности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-105.

Литература

1. Abrashev R.I., Pashova S.B., Stefanova L.N. et al. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger*. Canadian Journal of Microbiology. 54(12): 977–983.
2. Khan S., Nadir S., Shah Z.U. et al. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environmental Pollution. 225: 469–480.
3. Ruijter G.J.G., Bax M., Patel H. et al. 2003. Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores. Eukaryotic Cell. 2(4): 690–698.
4. Silva J.J.d., Iamanaka B.T., Ferranti L.S. et al. 2020. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. Journal of Fungi. 6 (4): 371.
5. Storz G., Imlayt J.A. 1999. Oxidative stress. Current Opinion in Microbiology. 2(2): 188–194.

Новая бактериолитическая амидаза *Lysobacter capsici* XL1

Кудрякова И.В.¹, Афошин А.С.¹, Тарлачков С.В.¹, Леонтьевская Е.А.¹,
Галемина И.Е.^{1,2}, Зеленов Д.В.^{1,2}, Леонтьевская Н.В.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

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

kudryakovairina@yandex.ru

²Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38692

Ключевые слова: антимикробные агенты, бактериолитические ферменты, *Lysobacter*, омикс-технологии, гомологичная система экспрессии, антибиотикорезистентность.

Проблема распространения множественно-устойчивых к антибиотикам микроорганизмов стоит в современной биомедицине остро как никогда. Эта проблема требует разработки новых антимикробных препаратов. В качестве основы для таких препаратов могут быть использованы бактериолитические ферменты, которые быстро и эффективно гидролизуют пептидогликан патогенных бактерий. Это определяет актуальность поиска, выделения и характеристики таких ферментов.

Основными продуцентами бактериолитических ферментов являются бактерии. Для поиска генов бактериолитических ферментов у грамотрицательной бактерии *L. capsici* XL1 был использован транскриптомный подход. В результате выявлен пул генов, у которых увеличился уровень экспрессии в условиях культивирования бактерии на среде, способствующей продукции антимикробных агентов. Среди этих генов есть гены известных бактериолитических ферментов и гены ферментов с предполагаемой бактериолитической активностью. Также проведено протеомное исследование белков культуральной жидкости *L. capsici* XL1, а полученные результаты сопоставлены с данными транскриптомного исследования. В результате был выбран ген интереса *ami*, кодирующий фермент N-ацетилмурамоил-L-амидазу.

Для выделения Ami, был разработан экспрессионный вектор pBBR1-P_{GroEL(A)}-*ami* и штамм на основе *L. capsici* IAEN-Ami. Из культуральной жидкости экспрессионного штамма с использованием методов колоночной хроматографии фермент Ami был выделен в гомогенном виде и охарактеризован. В качестве субстрата использовали автоклавированные клетки *Micrococcus luteus* Ac-2230^T. Установлено, что оптимальными условиями для проявления бактериолитической активности фермента являются pH 8.0, концентрация буфера Трис-HCl 5–10 mM, температура 60 °C. Фермент обладает литической активностью и в отношении живых клеток *M. luteus* Ac-2230^T, *Bacillus cereus* 217, *Staphylococcus aureus* 209P, *B. thuringiensis* VKM-83 и *B. megaterium* MS941.

Таким образом, новый бактериолитический фермент Ami является перспективным для создания на его основе новых антимикробных препаратов.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ (проект № МК-1864.2022.1.4).

Неорганические полифосфаты дрожжей: регуляторные функции и практические перспективы

Кулаковская Т.В.

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38693

Ключевые слова: дрожжи, полифосфаты, полифосфатаза, стресс.

Неорганические полифосфаты, анионные линейные полимеры, содержащие от нескольких до сотен фосфатных остатков, являются необходимым компонентом клеток дрожжей. Эти полимеры найдены в ядрах, вакуолях, митохондриях, цитоплазме и клеточной стенке. Наряду с очевидной ролью запасника фосфора и энергии, а также компонентов комплексов с ионами металлов, полифосфаты у дрожжей участвуют в процессах регуляции клеточного деления и адаптации к различным видам стресса. Эти полимеры регулируют активность ряда ферментов посредством полифосфорилирования по остаткам лизина, а также входят в состав специальных структур клеточной оболочки, необходимых для потребления гидрофобных субстратов и взаимодействия с клетками хозяина в случае патогенных процессов. Ферменты, участвующие в метаболизме полифосфатов, являются полифункциональными. Так полифосфатсинтаза Vtc4 является частью VTC комплекса вакуолярной мембранны, который, наряду с синтезом полифосфатов выполняет функцию шаперона протонной АТФазы этой мембранны и необходим для многих других процессов, протекающих в вакуолях. Полифосфатазы способны гидролизовать вторичные сигнальные соединения: полифосфатаза Ppx1 гидролизует цАМФ, а полифосфатаза Ddp1 гидролизует фосфоинозитотиды, содержащие один или два остатка пирофосфата. Значительные изменения в устойчивости к стрессам наблюдали в клетках *S. cerevisiae* как при нокаут-мутациях в генах, кодирующих полифосфатазы и полифосфатсинтазу Vtc, так и у штаммов, сверхэкспрессирующих полифосфатазы. Это явление, вероятнее всего, связано с пред-адаптационной активацией стрессовой устойчивости, которая была обнаружена у некоторых из этих штаммов. Полученные данные свидетельствуют в пользу современного представления о вовлечении полифосфатов и ферментов их метаболизма в различные адаптационные процессы, в том числе не связанные напрямую с фосфорным обменом.

Обращаясь к практическим перспективам, напомним, что полифосфатаза Ppx1 является высокоспецифичным реагентом для анализа полифосфатов в различных биологических объектах, в том числе в пищевых продуктах и достаточно широко применяется в исследовательских целях. Отметим также, что в организме млекопитающих наиболее оптимальным эффектором, влияющим на различные процессы, в том числе свертывание крови, развитие костной ткани, воспалительный ответ, являются полифосфаты со средней длиной цепи около 60–70 фосфатных остатков. Такие полифосфаты присутствуют в клетках дрожжей, причем в относительно большом количестве, могут быть получены путем несложных методик и использованы для получения новых данных о роли полифосфатов у млекопитающих и для разработки более эффективных костных имплантов, зубных паст и других перспективных препаратов для медицины.

Оценка чувствительности аденоцинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) тест-культуры *Clavibacter michiganensis* к фракции микробного пигмента штамма *Janthinobacterium lividum*

Ляховченко Н.С.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород,
lyakhovchenko@bsu.edu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38694

Ключевые слова: вторичные метаболиты, *Janthinobacterium lividum*, виолацейн (violacein), *Clavibacter michiganensis*, фитопатогены, чувство кворума, активность ферментов, аденоцинтрифосфатаза (КФ 3.6.1.3).

Известно, что фитопатологии являются существенной проблемой в растениеводстве. Многие из возбудителей заболеваний образуют ряд ферментов с высокой литической активностью и множество биологически активных веществ. Многие из средств защиты растений не способны избирательно блокировать биосинтез отдельных метаболитов и ферментов. В частности, препаратам химического происхождения присуще подавление микробного сообщества в широком спектре, снижая его почвенную активность. Согласно обозначенным тенденциям в стратегической программе ТП «Биотех-2030», планируется биологизация растениеводства: переход на средства защиты биологического происхождения. Бактерия *Clavibacter michiganensis* является карантинным организмом как в Европе, так и в Российской Федерации (Kleitman et al., 2008). Исходя из чего становится актуальным расширение ассортимента потенциальных штаммов как компонентов биопрепараторов, активных в отношении этого фитопатогена и ингибирующие активность его ферментов. Так, целью исследования стала оценка чувствительности аденоцинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) тест-культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 к фракции пигмента, образуемого штаммом *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D.

Фракцию пигмента виолацейна получали экстракцией изопропиловым спиртом из лиофильно высушенной биомассы *J. lividum* ВКМ В-3705D, выращенной в жидкой питательной среде (состав (г/л): пептон – 10,0; водопроводная вода). Смесь фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм, упаривали и смешивали со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:10. Пигмент, выпавший в осадок, отделяли фильтрованием и растворяли в 99% диметилсульфоксида (ДМСО). В ходе исследования была получена концентрированная фракция пигмента, концентрация которого, в пересчете на виолацейн, составила 28,4 г/л.

Противогрибковую активность оценивали по степени подавления удельного прироста оптической плотности (при длине волны $\lambda = 600$ нм) тест-культуры в 200 мл жидкой питательной среды (1% пептон). В среду вносили концентрированный и разведенные образцы фракции и растворителя в воде (4:0,5 и 4:0,25) в количестве 0,05%, 0,1% и 0,15% от объема среды на 24 час инкубации. В качестве контроля использовали ДМСО в тех же концентрациях. Контрольным вариантом выступали посевы без исследуемых веществ.

Влияние фракции виолацейна в ДМСО на активность неочищенной аденоцинтрифосфатазы (АТФ-азы, АТФ-фосфогидролазы) КФ 3.6.1.3 (МЕ/мин) оценивали по содержанию неорганического фосфата в реакционной смеси по окончании инкубации, содержащей АТФ в качестве субстрата для активности фермента (Bisswanger H., 2017). В качестве холостой пробы выступала смесь молибденовокислого аммония с аскорбиновой кислотой без фосфатов. Данные оптических единиц сравнивали со значениями для стандартного раствора KH_2PO_4 .

При культивировании клавибактера в присутствии фракции пигмента в ДМСО было выявлено, что разбавленные варианты не оказали существенного влияния на удельную скорость роста культуры, так как различие с контрольной группой было менее 20%, тогда как расчетные критерии достоверности Стьюдента ниже табличных. Степень подавления прироста неразбавленным ДМСО в количестве 0,05%

от объема среды составила 2,97%, относительно контрольного варианта. Такой эффект оказался несущественным, так как расчетный критерий достоверности Стьюдента ниже табличного. В свою очередь, в том же количестве неразбавленная фракция подавила прирост на 37,9%. При повышении содержания исследуемого вещества до 0,1% от объема среды выявлено, что степень подавления неразбавленного варианта пигмента составила 39,7%, тогда как для самого растворителя – 25,5%. Повышение содержания исследуемых вариантов в питательной среде до 0,15% от общего объема показало, что степень подавления удельного прироста неразбавленной фракцией пигмента составила 57,7%, для ДМСО – 11,8%.

В ходе оценки влияния фракции виолацена в ДМСО на активность АТФ-азы, выявлено, что концентрированный пигмент статистически значимо снизил активность фермента на 31,5% относительно контрольного варианта. При инкубации ферментного препарата с ДМСО было выявлено статистически значимое снижение активности на 8,3%. Таким образом, фракция виолацена в ДМСО оказывает больший ингибирующий эффект, чем сам растворитель.

Выявлено, что фракция виолацена в ДМСО проявила бактериостатическую активность в отношении штамма *Clavibacter michiganensis* BKM Ac-1402. Это может быть связано с ингибированием активности мембранный аденоинтрифосфатазы. Это указывает на потенциальную возможность использования пигмента в качестве компонента средств защиты растений. Однако, поиск возможного механизма действия виолацена в отношении микроорганизмов требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена в рамках гранта FZWG-2023-0007 «Адаптивные реакции микроорганизмов: теоретические и прикладные аспекты».

Изучение пробиотических свойств штамма *Ligilactobacillus salivarius* 7247 и его действия на *Salmonella* в комбинации с пребиотиком

Мачулин А.В.¹, Абрамов В.М.^{2,3}

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

² ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Москва

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова», Москва
and.machul@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38695

Ключевые слова: *Ligilactobacillus salivarius* 7247, пробиотики, бактериоцины, симбиотики, *Salmonella*.

Широкое использование антибиотиков в качестве кормовых добавок для стимулирования роста сельскохозяйственных животных способствовало появлению патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, обладающие множественной лекарственной устойчивостью (multiple drug resistance, MDR) (Igbinosa et al., 2023). Кроме того, частое и длительное применение антибиотиков не только повышает устойчивость сероваров сальмонелл к антибиотикам, но и нарушает нормальную микробиоту кишечника (Hammad, Shimamoto, 2010)clarithromycin and vancomycin by different inocula of 11 strains was evaluated using the antibiotic inactivation bioassay. None of the dairy probiotics showed a level of constitutive resistance or carried inducible resistance genes, making them suitable to be administrated with macrolides. Among the probiotics in tablet form only Enterococcus faecium strains carrying the msrC gene showed an MIC(90). Устойчивые к антибиотикам штаммы *Salmonella Enteritidis* (SE) и *Salmonella Typhimurium* (ST) у сельскохозяйственных животных могут напрямую передаваться человеку по пищевой цепи или опосредованно

передавать свои гены устойчивости патогенам человека с помощью мобильных генетических элементов, связанных с конъюгативными плазмидами. В настоящее время показана антисальмонеллезная активность некоторых молочнокислых бактерий и оценен их потенциал в качестве пробиотических кормовых добавок, в частности для борьбы с сальмонеллезом (Olivares et al., 2006). Таким образом, разработка активных альтернативных антибиотикам лекарственных препаратов на основе лактобактерий для профилактики и лечения экономически важных инфекций является актуальной задачей.

В данной работе были изучены пробиотические свойства штамма *Ligilactobacillus salivarius* 7247 (LS7247) и его действия на *Salmonella* в сочетании с пребиотиком.

Штамм LS7247 был выделен из кишечника и репродуктивной системы здоровой женщины. LS7247 показал высокий уровень толерантности как к желудочным, так и к кишечным условиям. Показано, что LS7247 эффективно прикреплялся к монослоям, образованным энтероцитами человека и животных, что является показателем долгосрочной реализации его пробиотических свойств. Показатели антисальмонеллезной активности LS7247 были значительно выше по сравнению со штаммами *L. salivarius* LA7234 и *L. salivarius* LG7528. Бесклеточный культуральный супернатант (cell-free culture supernatant, CFS) LS7247 также проявлял активность против сальмонеллы. Нейтрализация CFS щелочью (NaOH) привела к частичному снижению уровня его противосальмонеллезной активности. Полученные данные указывают на способность штамма LS7247 продуцировать дополнительные антисальмонеллезные факторы, такие как молочная кислота (lactic acid, LA) и бактериоцины. Нами было показано, что LS7247 производит высокий уровень LA: через 48 ч культивирования концентрация LA в CFS составила $124,0 \pm 2,5$ мМ.

Биоинформационный анализ кластеров генов, расположенных в хромосоме LS7247, выявил наличие генов отвечающих за выработку ферментов, разрушающих пептидогликаны: энтеролизина А и металлоэндопептидазы (полная последовательность генома штамма LS7247(2102-15) доступна в NCB GenBank, номера доступа CP090411:CP090413). Анализ других доступных геномов штаммов *L. salivarius* позволил установить, что они не содержат генов, ответственных за продукцию этих ферментов. Кроме того, кластер генов, расположенный в плазмиде pLS2102-15, отвечающий за продукцию бактериоцина класса IIb, аминокислотная последовательность которого идентична бактериоцину класса IIb, производимому штаммом *L. salivarius* UCC118, выделенным из кишечника человека. Также у LS7247 есть плазмида с кластером генов, ответственным за продукцию бактериоцина низина, с аминокислотной последовательностью, идентичной низину S свиного штамма *L. salivarius* P1ACE3.

Совместное культивирование LS7247 с патогенами SE и ST привело к снижению их жизнеспособности на 1,0–1,5 порядков. Это объясняется повреждением клеточной стенки и утечкой АТФ, вызванными CFS.

Полученные данные позволяют утверждать, что LS7247 способен продуцировать комплекс факторов (молочная кислота, бактериоцин класса IIb, низин S), которые повышают проницаемость внешней мембраны сальмонелл и обеспечивают доступ энтеролизина А и металлоэндопептидазы к пептидогликану, приводящие в итоге к лизису клеточной стенки. Кроме того, нами первые было показано, что CFS штамма LS7247 ингибирует адгезию возбудителей SE и ST к энтероцитам человека и животных. В экспериментах по комбинации пребиотика Actigen (Alltech Inc.) и CFS LS7247 были получены значительные общие эффекты в ингибировании адгезии SE и ST к энтероцитам человека и животных (Abramov et al., 2023).

Все полученных результаты подчеркивают потенциал использования штамма LS7247 в качестве профилактической меры для борьбы с распространенностью сальмонеллеза у животных и людей, вызванного штаммами возбудителей SE и ST с MDR.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (Соглашение от 01.07.2022 № 075-15-2022-1124).

Литература

1. Abramov V.M., Kosarev I.V., Machulin A.V., Deryusheva E.I., Priputnevich T.V., Panin A.N., Chikileva I.O., Abashina T.N., Manoyan A.M., Ahmetzyanova A.A., Ivanova O.E., Papazyan T.T., Nikonorov I.N., Suzina N.E., Melnikov V.G., Khlebnikov V.S., Sakulin V.K., Samoilenko V.A., Gordeev A.B., Sukhikh G.T., Uversky V.N. 2023. Ligilactobacillus salivarius 7247 strain: probiotic properties and anti-Salmonella effect with prebiotics // Antibiotics. V. 12. № 10. P. 1535. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101535>

2. Hammad A.M., Shimamoto T., 2010. Towards a compatible probiotic-antibiotic combination therapy: assessment of antimicrobial resistance in the Japanese probiotics. // J. Appl. Microbiol. V. 109. № 4. P. 1349–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04762.x>
3. Igbinosa I.H., Amolo C.N., Beshiru A., Akinnibosun O., Ogofure A.G., El-Ashker M., Gwida M., Okoh A.I., Igbinosa E.O. 2023. Identification and characterization of MDR virulent *Salmonella* spp isolated from smallholder poultry production environment in Edo and Delta States, Nigeria. // PLoS One. V. 18. № 2. P. e0281329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281329>
4. Olivares M., Díaz-Ropero M.P., Martín R., Rodríguez J.M., Xaus J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. // J. Appl. Microbiol. V. 101. № 1. P. 72–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x>

Материально-энергетический баланс метаногенеза

Минкевич И.Г.

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38696

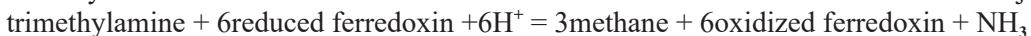
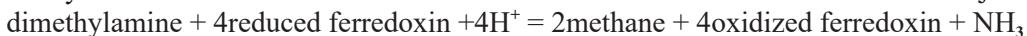
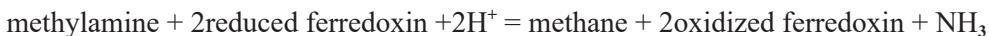
Ключевые слова: метаногенез, метаболические пути, субстраты, восстановленность, энергия.

Метаногенез представляет большой интерес в нескольких аспектах. Это процесс, специфический с точки зрения его биохимии и биоэнергетики, играющий большую экологическую роль и, в технологическом плане перспективный для утилизации органических отходов путём их конверсии в удобный энергоноситель.

Данная работа посвящена энергетике путей образования метана, которая важна для понимания того, как функционируют в целом клетки метаногенов.

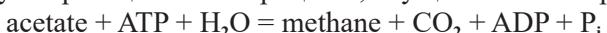
Метаболические пути образования метана можно разделить на две группы – те, что конвертируют одноуглеродные субстраты в метан, и те, что образуют метан из исходного соединения с более высоким числом атомов углерода. Конверсия каждого субстрата требует специфических реакций, но ряд реакций и их интермедиатов присутствуют во всех этих путях. В частности, общим является участие ферредоксина Fd как переносчика восстановленности.

В случае любого одноуглеродного субстрата его молекула должна получить дополнительную восстановленность, поскольку в метане углерод наиболее восстановлен по сравнению со всеми остальными органическими соединениями. Источником дополнительной восстановленности является восстановленный ферредоксин Fd^{red}. Брутто-реакции образования метана из некоторых одноуглеродных соединений имеют вид:



Увеличение восстановленности субстрата означает сообщение ему дополнительной энергии.

Образование метана из ацетата требует затраты макроэргического соединения – АТР. Это видно из брутто-реакций этого процесса, осуществляемого различными видами бактерий:



Одним из интермедиатов этого пути является acetyl-CoA. Поскольку последнее соединение образуется при метаболизации углеводов, липидов и других соединений, то «ацетатный» путь образования метана,

очевидно, является составной частью метаболизма метаногенеза из многих органических источников. Восстановление ацетата в целом не происходит. Имеет место перераспределение исходной восстановленности – она вся передаётся образуемой молекуле метана, а остальной углерод ацетата полностью теряет восстановленность, переходя в CO_2 . Ферредоксин не включён в общий баланс этого процесса, но он участвует в двух реакциях этого пути, отдавая, а затем принимая восстановленность от специфических переносчиков метильной группы.

Конверсия одноуглеродных субстратов в метан, напротив, требует поступления восстановленного ферредоксина Fd^{red} . Он имеет более высокий энергетический уровень, чем NADH или NADPH. Окислительно-восстановительный потенциал Fd^{red} равен -420 мв, тогда как для NADH и NADPH он равен -320 мв. В анаэробных условиях восстановление ферредоксина возможно, например, в метаболизме углеводов. Пример – сопряжённая с ферредоксином глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.2.7.6).

Рассмотрение вышесказанного позволяет сделать следующие выводы:

1. Метabolicкие пути, специфические для образования метана из органических субстратов, не являются энергодающими. Напротив, они требуют вложения энергии в виде добавочной восстановленности или макроэргических связей.

2. Источником дополнительной восстановленности для образования метана из одноуглеродных субстратов является ферредоксин – переносчик, имеющий более высокий энергетический уровень, чем НАДН и НАДФН. Ферредоксин также участвует как интермедиат в путях образования метана, идущих через acetyl-CoA. В число других процессов, использующих этот высокоэнергетический переносчик восстановленности, входит фотосинтез.

3. Синтез метана из одноуглеродных соединений или ацетата требует одновременного потребления иных субстратов, дающих в анаэробных условиях энергию для метаногенеза. Такими субстратами, например, являются углеводы.

4. Взгляд на метаногенез как разновидность анаэробного дыхания нельзя считать корректным, так как в нём нет участия мембранный электрон-транспортной цепи и АТФ-синтазы.

5. Конверсия агрессивных субстратов (метанол, органические кислоты) в метан, будучи энергозатратным процессом, должна иметь особый смысл. Таковым является удаление этих веществ из среды, поскольку метан имеет малую растворимость в воде и выходит в атмосферу, а также не обладает токсичностью.

Количество пролиновых остатков в HlyIICTD определяет его изомеризацию

Нагель А.С.¹, Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Сиунов А.В.¹,
Каратовская А.П.², Замятина А.В.², Ветрова О.С.², Иванова Т.Д.¹,
Руденко Н.В.², Солонин А.С.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

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

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38697

Ключевые слова: гемолизин II *B. cereus*, моноклональные антитела, электрофоретическая подвижность, цис- и транс-формы.

Гемолизин II *Bacillus cereus* относится к порообразующим бета-складчатым токсинам и имеет С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначенное как HlyIICTD (С-концевой домен) [1]. На

сегодняшний день функция и роль HlyPICTD в формировании пор и цитолизе еще не выяснены. Изучение функционирования и значения отдельных частей гемолизина II может приблизить нас к пониманию этапов порообразования. Рекомбинантный белок HlyPICTD был использован для получения моноклональных антител [2]. При денатурирующем электрофорезе очищенного белка выявляются несколько изоформ HlyPICTD с различной электрофоретической подвижностью [3]. Было сделано предположение, что появление изоформ связано с наличием остатка пролина в 405 положении (нумерация соответствует полной длине токсина HlyII *B. cereus* 14579^T). Для этого были получены генно-инженерные конструкции HlyPICTD, содержащие разное количество остатков пролина. Анализ электрофорограмм полученных рекомбинантных белков показал, что у белка, не содержащего пролина как мономерная, так и димерная и олигомерная формы белка демонстрируют одну изоформу, белок с одним пролином – две изоформы в олигомерном состоянии, у белка с двумя пролинами выявляются 4 изоформы в мономерном состоянии. Белок с 3-мя пролинами должен демонстрировать 8 изоформ. При анализе иммуноблоттинга препаратов HlyPICTD выявлено, что в олигомерной и димерной форме существуют только гомоолигомерные изоформы, так как количество выявляемых полос соответствует количеству изоформ. При наличии гетероолигомерных форм белка количество выявляемых полос было бы значительно больше. Предварительные эксперименты по разделению изоформ с помощью гель-фильтрации позволяют предположить возможность выделения отдельных изоформ HlyPICTD.

Таким образом, предположение о цис/транс-изомеризации остатков пролина в HlyPICTD как основе появление изоформ мы считаем доказанным. HlyPICTD находится в динамическом равновесии благодаря цис/транс-изомеризации его пептидной связи Gly404–Pro405. Цис- и транс-формы находятся в эквимолярных количествах [4]. HlyPICTD в котором пролин был заменен метионином, стабилизируя исключительно транс-состояние, использовался для проведения ЯМР-исследований [5]. ЯМР-исследование 3D-структуры HlyPICTD продемонстрировало его уникальность, заключающуюся в предполагаемом наличии двух субдоменов. На сегодняшний день молекул подобной структуры не обнаружено. Мы ожидаем, что изучение HlyPICTD прольет свет на новые функции его необнаруженных структурных гомологов. Множество изоформ белков могут обеспечивать лабильность их пространственных структур и расширять функциональные возможности.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-74-10026.

Литература

1. *Baida G., Budarina Zh.I., Kuzmin N.P. and Solonin A.S. (1999): Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett.* 180(1), 7-14.
2. *Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. C-Terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II is able to interact with erythrocytes. Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020, 46, 321-326, 10.1134/S1068162020030188
3. *Rudenko N., Siunov A., Zamyatina A., Melnik B., Nagel A., Karatovskaya A., Borisova M., Shepelyakovskaya A., Andreeva-Kovalevskaya Z., Kolesnikov A., Surin A., Brovko F., Solonin A. The C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II oligomerizes by itself in the presence of cell membranes to form ion channels. Int J Biol Macromol.* 2022 Mar 1;200:416-427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.013. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35041890.
4. *Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T. NMR structure of the *Bacillus cereus* hemolysin II C-terminal domain reveals a novel fold Sci. Rep.*, 7 (2017), p. 3277, 10.1038/s41598-017-02917-4
5. *Kaplan A.R., Olson R., Alexandrescu A.T. Protein yoga: conformational versatility of the hemolysin II C-terminal domain detailed by NMR structures for multiple states Protein Sci.*, 30 (2021), pp. 990-1005, 10.1002/pro.4066. PMID: 33733504; PMCID: PMC8040871.

Замена аминокислотных остатков на поверхности С-концевого домена HlyII *Bacillus cereus* влияет на доступность конформационных эпитопов

Нагель А.С.¹, Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Мельник Б.С.², Ветрова О.С.²,
Сиунов А.В.¹, Караповская А.П.², Замятин А.В.², Шляпников М.Г.¹,
Руденко Н.В.², Бровко Ф.А.², Солонин А.С.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

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

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38698

Ключевые слова: сайт – направленный мутагенез, 3D структура, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Гемолизин II (HlyII) – один из патогенных факторов *Bacillus cereus*, порообразующий β-бочковый токсин – обладает С-концевым удлинением из 94 аминокислотных остатков, обозначенным как С-концевой домен HlyII (HlyIICTD), который играет важную роль в функционировании токсина [1, 2]. Ранее было описано моноклональное антитело HlyIIC-20, способное штаммоспецифически ингибировать гемолиз, вызываемый HlyII, и продемонстрирована зависимость эффективности гемолиза от присутствия пролина в положении 324 в HlyII вне конформационной антигенной детерминанты [3]. Аминокислотные остатки пролина в белке могут существенно менять его конформационное состояние. Пролин-зависимые конформационные перестройки трехмерной структуры белка могут приводить к изменению доступности эпитопов. В связи с этим можно предположить, что остаток пролина не обязательно входит в состав эпитопа. Использование сайт-направленного мутагенеза позволяет детально определить расположение эпитопов на поверхности С-концевого домена HlyII.

Для уточнения расположения эпитопа для HlyIIC-20 на поверхности HlyIICTD согласно пространственной структуре, определенной NMR [4], учитывая результаты фагового дисплея, были выбраны аминокислотные остатки, которые могут входить в состав эпитопа [15]. Было спроектировано 16 мутантных форм HlyIICTD и исследовано связывание HlyIIC-20 с мутантными белками методом иммуноферментного анализа (ИФА). Созданы не только одиночные, но и множественные замены (одновременно заменены две, три или четыре аминокислотных остатка), поскольку одиночная замена может незначительно скажаться на взаимодействии с антителом. Предполагалось, что замена аминокислотных остатков, входящих в эпитоп, узнаваемый HlyIIC-20, повлияет на его взаимодействие с мутантной формой, и в свою очередь замена аминокислотных остатков, не входящих в эпитоп, не должна оказывать влияние на этот факт. Однако, все спроектированные замены аминокислотных остатков на поверхности HlyIICTD с различной степенью эффективности снижали уровень взаимодействия с антителом HlyIIC-20. Такое влияние мутаций на связывание мутантных форм с антителом возможно, если аминокислотные замены влияют на 3D структуру HlyIICTD, меняя конформацию этого белка. При переходе HlyIICTD в другую конформацию взаимное расположение аминокислот на его поверхности изменяется, и эпитоп частично или полностью «разрушается», что и приводит к уменьшению связывания антитела HlyIIC-20 с HlyIICTD.

Исследование взаимодействия мутантных форм с HlyIIC-20 было проведено с использованием в качестве контрольного антитела HlyIIC-40, представителя панели моноклональных антител, получение которой было описано в [5]. Выбор этих антител был обусловлен тем, что значения $K_{\text{афф}}$, характеризующие взаимодействие этих антител с HlyIICTD оказались близкими. При этом эти антитела не конкурировали друг с другом за связывание с иммобилизованным HlyIICTD в ходе конкурентного ИФА. Следовательно, эти MA узнают неперекрывающиеся участки на поверхности пространственной структуры HlyIICTD.

Сравнение влияния мутаций на эффективность взаимодействия HlyIICTD с HlyIIC-20 и контрольного антитела узнающего неперекрывающийся эпитоп позволили выявить аминокислотные остатки N339, K340, входящие в конформационную антигенную детерминанту, узнаваемую HlyIIC-20. Двойная замена

N339A, K340A совсем не повлияла на связывание HlyIIC-40, но значительно ингибировала связывание с HlyIIC-20.

Замена внеэпипотопных аминокислотных остатков изменяет доступность конформационных эпипотов С-концевого домена *B. cereus* HlyII. Изменения структуры эпипотов подтверждают высокую конформационную подвижность HlyIICCD необходимую при функционировании HlyII. Показана лабильность пространственной структуры HlyIICCD. Этот результат объясняет сложности, которые возникают при поиске антител ингибирующих работу подвижных белков, в частности токсинов, структура которых сильно меняется при их функционировании.

Работа поддержанна грантом РНФ № 22-74-10026.

Литература

1. *Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P., Solonin A.S.* Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus* FEMS Microbiol. Lett., 180 (1999), pp. 7-14, 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x
2. *Miles G., Bayley H., Cheley S.* Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: a heptameric transmembrane pore Protein Sci., 11 (2002), pp. 1813-1824, 10.1110/ps.0204002
3. *Rudenko N., Nagel A., Zamyatina A., Karatovskaya A., Salyamov V., Andreeva-Kovalevskaya Z., Siunov A., Kolesnikov A., Shepelyakovskaya A., Boziev K., Melnik B., Brovko F., Solonin A.* A Monoclonal Antibody against the C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* Hemolysin II Inhibits HlyII Cytolytic Activity. Toxins (Basel). 2020 Dec 19;12(12):806. doi: 10.3390/toxins12120806. PMID: 33352744; PMCID: PMC7767301.
4. *Kaplan A.R., Olson R., Alexandrescu A.T.* Protein yoga: conformational versatility of the hemolysin II C-terminal domain detailed by NMR structures for multiple states Protein Sci., 30 (2021), pp. 990-1005, 10.1002/pro.4066. PMID: 33733504; PMCID: PMC8040871
5. *Rudenko N., Siunov A., Zamyatina A., Melnik B., Nagel A., Karatovskaya A., Borisova M., Shepelyakovskaya A., Andreeva-Kovalevskaya Z., Kolesnikov A., Surin A., Brovko F., Solonin A.* The C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II oligomerizes by itself in the presence of cell membranes to form ion channels. Int J Biol Macromol. 2022 Mar 1;200:416-427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.013. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35041890.

Моделирование трансдукции плазмид фагами RB43, RB49 в микробиоте мыши

Никулина А.Н.¹, Никулин Н.А.¹, Павлов В.М.^{2,3}, Федотова А.Ю.^{2,3},
Шорохова А.П.¹, Дьяченко И.А.², Мурашев А.Н.², Зимин А.А.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН –
обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук», Пущино

² Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино

³ Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино
e-mail: a.karmanova@ibpm.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38699

Ключевые слова: фаговая терапия, общая трансдукция, RB43, RB49.

В период нарастающих проблем с антибиотикорезистентностью микроорганизмов ведется непрерывный поиск новых средств для предотвращения заболеваний, вызываемых бактериями. Фаговая терапия –

достаточно перспективный вариант лечения бактериальных инфекций, вновь начинаящий набирать популярность. Некоторые фаговые коктейли уже используются как средство терапии для пациентов, пораженных резистентными ко всем классам антибиотиков штаммами таких патогенов как *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.* и тп [1]. Тем не менее, применение фаговой терапии сопряжено с рядом рисков, которые необходимо учитывать при составлении безопасного и эффективного препарата на основе фагов. Так, например, не рекомендуют использование фагов с лизогенным циклом развития, поскольку они чаще способны к специализированной трансдукции, за счет которой может происходить перенос в том числе и факторов патогенности между клетками. Но часть лизических фагов способна к другому виду трансдукции – общей – переносу плазмидной или хромосомной ДНК бактерии хозяина. Так, например, в ряде опытов *in vitro* было показано, что частицы T4-подобных фагов RB42, RB43, RB49 способны передавать плазмидные и биплазмидные системы с высокой частотой – 10^{-3} – 10^{-6} [2]. У многих штаммов бактерий патогенность определяется факторами, кодируемыми генами именно плазмидной ДНК. Следовательно использование фагов, способных к такому роду горизонтального переноса, может повлечь за собой негативные последствия в виде ухудшения состояния пациента. Таким образом, имеется необходимость в исследовании общей фаговой трансдукции в живых системах, в частности в кишечнике мыши, для лучшего понимания механизмов горизонтального переноса генов внутри кишечной микробиоты.

Было проведено несколько экспериментов по трансдукции плазмид pUC19 фагом RB43 в бактерию-реципиент *E. coli GM1737* и плазмиды pTurbo-GFP-B фагом RB49 в *E. coli KLF-47* и *E. coli 5 K*. Бактерии-реципиенты вводились в ЖКТ мышей заранее. В результате было получено, что в кишечнике опытных мышей происходит образование трансдуктантов спустя 2 часа после введения препарата с трансдукирующими частицами. Критерии отбора трансдуктантов были следующие: характерный рост и цвет колоний на дифференциальной среде МакКонки с добавлением селективных антибиотиков, ПЦР-тесты, рестрикционный анализ плазмид и оценка флуоресценции колоний для трансдуктантов с pTurbo-GFP-B. Подробные результаты представлены в табл. 1. Также, по всей видимости, происходят вставки или мутации в плазмидной ДНК.

Таблица 1

**Результаты опытов моделирования трансдукции плазмид фагами RB43, RB49
в мышиной микробиоте**

№ опыта	Штамм-реципиент	Фаг/плазмидная система	Локализация трансдуктантов	Среднее значение КОЕ/г органа мыши или КОЕ/мл трансдуктантов для толстого кишечника
1	<i>E. coli GM1737</i>	RB43/pUC19	Толстый кишечник	$2,5 \cdot 10^2$ КОЕ/мл
2	<i>E. coli GM1737</i>	RB43/pUC19	Тонкий и толстый кишечник, фекалии	$6,8 \cdot 10^1$ КОЕ/г
3	<i>E. coli KLF-47</i>	RB49/pTurbo-GFP-B	Толстый кишечник	$4,1 \cdot 10^2$ КОЕ/мл
4	<i>E. coli 5 K</i> .	RB49/pTurbo-GFP-B	Толстый кишечник	$1,5 \cdot 10^1$ КОЕ/г

Таким образом, по результатам нескольких опытов можно сказать, что частота трансдукции плазмидной ДНК за счет фагов RB43, RB49 в *E. coli* в бактерии кишечнике мыши почти сопоставима с диапазоном частоты этого процесса *in vitro*. Вероятно, чаще могут происходить и изменения плазмидной ДНК во время проведения трансдукции *in vivo* по сравнению с процессом *in vitro*. Предположительно, подобный процесс общей трансдукции в природных условиях может оказывать существенное влияние на кишечную микробиоту, способствуя приобретению бактериями генов антибиотикорезистентности или факторов патогенности. Исходя из наших данных следует более тщательно подходить к выбору агентов для фаговой терапии и проверять их не только на способность к специфической трансдукции, но и к общей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>.

Литература

1. Nikulin N., Nikulina A., Zimin A., Aminov R. Phages for treatment of Escherichia coli infections. Prog Mol Biol Transl Sci. 2023;200:171–206. doi:10.1016/bs.pmbts.2023.03.011
 2. Tanyashin V.I., Zimin A.A., Shlyapnikov M.G., Boronin A.M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages. Russian Journal of Genetics 39, 761–772 (2003). <https://doi.org/10.1023/A:1024748903232>.
-

Штамм-нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* F2-2: метаболический потенциал и фитостимулирующие свойства

Пунтус И.Ф.¹, Чайка Н.Я.², Захарченко Н.С.³, Анохина Т.О.¹, Позднякова-Филатова Т.Ю.¹,
Ахметов Л.И.¹, Шутов А.А.¹, Делеган Я.А.¹, Звонарев А.Н.¹, Филонов А.Е.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

e-mail: puntus66@mail.ru

² Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино
e-mail: nelli_chayka_ya@mail.ru

³ Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пущино, e-mail: zachar@bibch.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38700

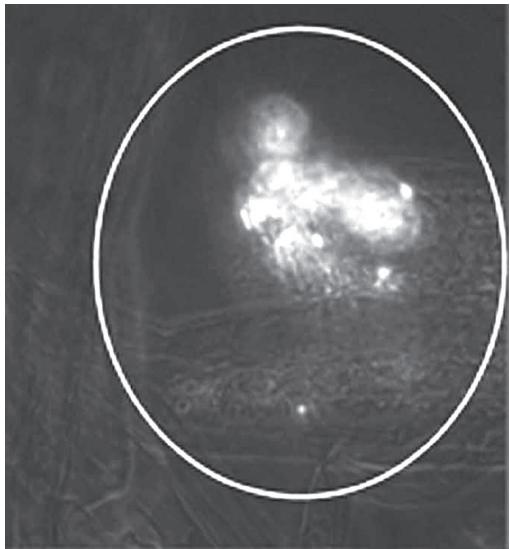
Ключевые слова: биоремедиация, биодеградация, нефть, штаммы-нефтедеструкторы, фитостимуляция.

Штамм-нефтедеструктор *R. qingshengii* F2-2 выделен из почвы (Puntus et al., 2019) нефтяного месторождения Фестивальное (ЯНАО). Способен расти в среде с н-алканами, фенолом, дизельным топливом, сырой нефтью в качестве единственных источников углерода в широком температурном диапазоне (от 4 до 40 °C). При росте в среде с гексадеканом эффективно снижает поверхностное натяжение до 30 мН/м за счёт продукции биосурфактантов трегалолипидной природы.

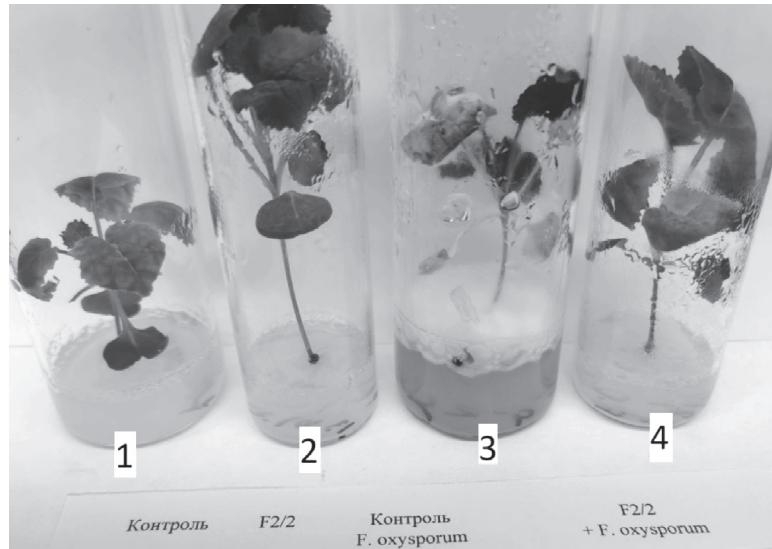
В настоящее время катаболический потенциал углеводородокисляющих родококков изучен достаточно хорошо, однако, очень мало известно о фитостимулирующих свойствах и антимикробной активности родококков-нефтедеструкторов.

При поиске генных кластеров продукции вторичных метаболитов в геноме штамма *R. qingshengii* F2-2 нами обнаружен кластер генов биосинтеза феназинов на плазмиде pLP156, которые являются антибиотиками, подавляющими фитопатогенные грибы. Также обнаружены гены биосинтеза растительных гормонов: ауксинов и гибереллинов, стимулирующих рост растений. При экстрагировании феназинов штамма *R. qingshengii* F2-2 в качестве контроля был выбран штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, синтезирующий соединения феназинового ряда, а также стимулирующий рост растений (Сиунова с соавт, 2017). Тонкослойная хроматография экстрактов культуральной жидкости штаммов F2-2 и BS1393 выявила спектр схожих интенсивно окрашенных пятен, что свидетельствует о наличии феназиновых соединений в культуральной жидкости штамма F2-2. Экстракти культуры жидкости обоих штаммов были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На ВЭЖХ-профиле пробы BS1393 обнаружен пик, соответствующий по времени удержания феназинкарбоновой кислоте. Несмотря на то, что феназинкарбоновая кислота в экстракте культуральной жидкости штамма *R. qingshengii* F2-2 не была обнаружена, можно предположить наличие других феназиновых соединений, производимых этим штаммом.

Для изучения колонизации растений штамм F2-2 был трансформирован плазмидой pMyCA_gfp, содержащей ген белка зелёной флуоресценции *gfp*, который даёт возможность колониям светиться в



А



Б

Рис. 1. Взаимодействие *R. qingshengii* F2-2 с проростками горчицы: А – колонизация корешков горчицы клетками штамма F2-2 gfp, Б (1, 2) – ростстимулирующее действие штамма на горчицу через четыре недели (колонизированное растение и проросток без колонизации), Б (3, 4) – защитный эффект штамма для проростка горчицы, заражённого фитопатогенным микромицетом *F. oxysporum* (колонизированное растение и проросток без колонизации)

УФ-свете. Листья проростков горчицы были обработаны суспензией штамма F2-2. С использованием флуоресцентной микроскопии продемонстрирована колонизация листьев и корней горчицы исследуемым штаммом (рис. 1А).

Ростстимулирующий эффект штамма F2-2 наблюдали в отношении рапса и горчицы (рис. 1Б (1, 2)). В культуральной жидкости штамма обнаружена индолил-3-уксусная кислота в концентрации около 3 мкг/мл.

Для изучения защитных свойств штамма F2-2 горчица и рапс были заражены *Fusarium oxysporum*. Через 10 суток мы наблюдали активный рост рапса, колонизированного исследуемым штаммом. У рапса, не обработанного штаммом F2-2, наблюдали признаки заболевания: замедление роста и пожелтение листьев (рис. 1Б (3, 4)). Штамм *R. qingshengii* F2-2 также проявляет выраженный антагонизм в отношении фитопатогенных микромицетов *Fusarium graminearum* и *Gaeumannomyces graminis var tritici*.

Таким образом, штамм-нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* F2-2 стимулирует рост рапса и горчицы, колонизирует листья и корни рапса, содержит кластер генов биосинтеза феназинов и гены синтеза фитогормонов: ауксинов и гиббереллинов, обладает антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов. Обнаруженные фитостимулирующие свойства штамма F2-2 свидетельствуют о его перспективности для использования в биотехнологиях защиты сельскохозяйственных растений и повышения их урожайности.

Литература

1. Puntus I.F., Borzova O.V., Funtikova T.V., Suzina N.E., Egozarian N.S., Polyvtseva V.N., Akhmetov L.I., Golovleva L.A., Solyanikova I.P., Shumkova E.S. Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation // Journal of Soils and Sediments. – 2019. – V. 19. – No 8. – P. 3166–3177.
2. Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Сизова О.И., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кочетков В.В., Боронин А.М., Patil S.G., Chaudhari A.B. Штаммы PGPR *Pseudomonas*, перспективные для создания биопрепараторов для защиты и стимуляции роста растений // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 2. – С. 56–67.

Вторичные метаболиты гриба *Penicillium thymicola* фумихиназолины F и G как потенциальные ингибиторы эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток рака молочной железы

Рысцов Г.К., Антипова Т.В., Ренфельд Ж.В., Шляпников М.Г., Земскова М.Ю.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
gleb.8.ristsoff@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38701

Ключевые слова: *Penicillium thymicola*, вторичные метаболиты, фумихиназолины, противоопухолевые соединения, эпителиально-мезенхимальный переход.

Вторичные метаболиты грибов рода *Penicillium* являются многообещающими источниками новых химических соединений, которые могут найти применение в медицине. Было показано, что выделенные из культуральной среды *P.thymicola* фумихиназолины F и G (стереоизомеры с молекулярной массой 358.4 г/моль) обладают способностью ингибировать рост грибов [1] и клеток опухолей мышей (лимфолейкоза линии P 388) [2]. Однако, характер его ингибирующего действия и механизмы не были установлены.

Ранее мы показали, что фумихиназолины F и G ингибируют рост клеток рака молочной железы человека. В настоящем исследовании был проведён анализ клеточного цикла клеток MDA-MB-231 в присутствии различных концентраций фумихиназолина F и показано, что метаболит блокирует клеточное деление посредством накопления количества клеток в фазе G1 и соответствующим уменьшением клеток в фазах S (репликация) и G2 (митоз). Также было отмечено увеличение клеточной гибели, указывающее на цитотоксическое действие препарата.

Далее, мы исследовали изменение экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода/трансформации (ЭМТ) под воздействием фумихиназолинов. ЭМТ – комплексный процесс, связанный с изменением фенотипа опухолевых эпителиальных клеток на мезенхимальный, этот процесс приводит к усилению клеточной миграции и инвазии. Появление мезенхимальных клеток в опухоли приводит к распространению раковых клеток в организме и образованию метастаз. Анализ уровня мРНК посредством ПЦР в реальном времени не выявил изменений в транскрипции маркёров ЭМТ, однако, иммуноферментный анализ показал, что в присутствии фумихиназолина F в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 происходит концентрационно-зависимое снижение уровня белка виментина, при этом уровень э-кадгерина повышается. Также в настоящем исследовании посредством вестерн-блот анализа, было установлено, что под воздействием фумихиназолина F происходит снижение стабильности белка CD44 и, следовательно, его уровня в клетке. Поскольку основной функцией CD44 является регулирование миграции клеток за счет узнавания и связывания гиалуроновой кислоты межклеточного матрикса мы исследовали влияние фумихиназолина F на прикрепление клеток MDA-MB-231 к подложке, покрытой гиалуроновой кислотой. Нами было установлено, что обработка фумихиназолином F приводит к снижению способности клеток прикрепляться к субстрату в 1.6 раза по сравнению с необработанным контролем.

Таким образом проведённый нами сравнительный анализ экспрессии молекулярных маркёров ЭМТ в клетках рака груди MDA-MB-231 (линии, обладающей устойчивостью к лекарственным препаратам и соотносимой с более поздними стадиями онкологических заболеваний) показал, что клетки MDA-MB-231 имеют мезенхимоподобный фенотип, сопровождаемый высоким уровнем виментина и CD44 и низким – е-кадгерина. Поскольку фумихиназолин F повышает экспрессию э-кадгерина, снижает уровень виментина и CD44, можно предположить, что этот метаболит *P.thymicola* индуцирует реверсирование мезенхимальных клеток MDA-MB-231 к эпителиальному фенотипу, который наблюдается для менее злокачественных новообразований. Функциональным проявлением изменений в уровнях этих белков

вследствие обработки клеток фумихиназолинами является ингибирование миграции клеток MDA-MB-231.

Вывод

В основе противоопухолевых свойств фумихиназолинов F и G лежит ингибирование эпителиально-мезенхимной трансформации и реверсирование состояния злокачественных клеток к менее патологическому фенотипу.

Литература

1. He F., Sun Y.L., Liu K.S., Zhang X.Y., Qian P.Y., Wang Y.F., Qi S.H. Indole alkaloids from marine-derived fungus Aspergillus sydowii SCSIO 00305. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012 Feb;65(2):109-11. doi: 10.1038/ja.2011.117. Epub 2011 Dec 21. PMID: 22186592.
2. Takahashi C., Matsushita T., Doi M., Minoura K., Shingu T., Kumeda Y., Numata A. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. 1995. № 18. P. 2345–2353
3. Xu Y., Yu Q. E-cadherin negatively regulates CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8661-8. doi: 10.1074/jbc.M208181200. Epub 2003 Jan 2. PMID: 12511569.

Физиологические особенности штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при нокаут-мутациях генов *PPN1* и *PPN2*, кодирующих полифосфатазы

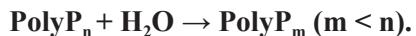
Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Кулаковская Т.В.

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

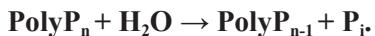
DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38702

Ключевые слова: дрожжи, полифосфаты, полифосфатаза, стресс, *PPN1*, *PPN2*.

Неорганические полифосфаты (PolyP) выполняют в клетках дрожжей многочисленные функции, от резервирования фосфата до регуляции экспрессии некоторых генов и активности ферментов. К числу ферментов метаболизма этих полимеров относятся полифосфатазы Ppn1 и Ppn2 (Sethuraman et al. 2001; Gerasimait and Mayer, 2017; Andreeva et al., 2019). Оба фермента проявляют эндополифосфатазную активность, катализируя реакцию:



Фермент Ppn1 также проявляет экзополифосфатазную активность, отщепляя фосфат с конца полимерной цепи:



Ферменты Ppn1 и Ppn2 различаются клеточной локализацией: Ppn2 локализован в вакуолярной мембране, Ppn1 также локализуется преимущественно в вакуолях, но наблюдается в цитоплазме при избытке фосфата и, как предполагается, отвечает за экзополифосфатазную активность в митохондриальной мембране и ядре. Влияние нокаут-мутаций в генах *PPN1* и *PPN2* на метаболизм PolyP варьировало в зависимости от стадии роста и условий культивирования. Целью работы было изучение влияния нока-

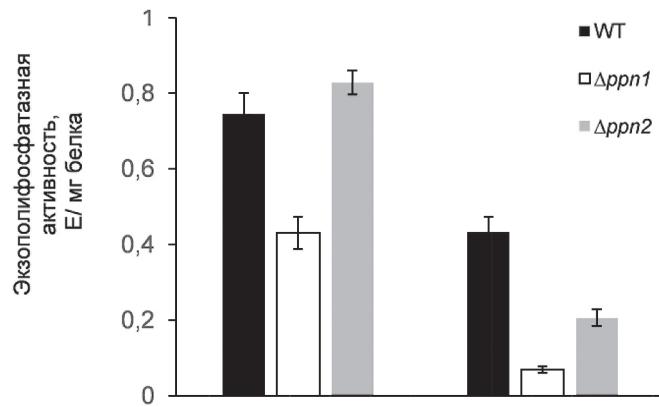


Рис. Экзополифосфатазная активность в бесклеточном экстракте (столбцы слева) и общей мембранный фракции (столбцы справа) полученных из клеток штаммов дикого типа (WT) и мутантов $\Delta ppn1$ и $\Delta ppn2$

ут-мутаций $\Delta ppn1$ и $\Delta ppn2$ с использованием стандартных коммерческих мутантов *S. cerevisiae* фирмы Dharmaccon на рост, содержание и длину цепи различных фракций PolyP, полифосфатазную активность и устойчивость к стрессу.

Данные мутации не оказали влияния на рост дрожжей в средах с глюкозой и 1% этанолом.

Сравнение активности полифосфатаз в препаратах бесклеточного экстракта и общей мембранный фракции, полученных из клеток штаммов WT (BY4741), $\Delta ppn1$ и $\Delta ppn2$, выращенных до стационарной стадии роста на глюкозе, показало, что как экзополифосфатазная активность (рис.), так и эндополифосфатазная активность значительно снижены у мутанта $\Delta ppn1$ в обоих фракциях, тогда как у мутанта $\Delta ppn2$ – только в мембранный фракции. Это согласуется с литературными данными о локализации этих ферментов (Gerasimait and Mayer, 2017; Andreeva et al., 2019).

Таблица

Содержание PolyP в клетках штаммов WT, $\Delta ppn1$ и $\Delta ppn2$, выращенных на среде YPD с 2% глюкозой до стационарной стадии роста

Содержание во фракции, мкмоль / г сырой биомассы	Штамм		
	WT	$\Delta ppn1$	$\Delta ppn2$
Pi	22,4	21,3	14,9
PolyP1	31,2	31,3	13,6
PolyP2	32,5	26,2	17
PolyP3	22,4	22,9	42,6
PolyP4	2,1	1,9	2,7
PolyP5	5	3,9	8,5

Отличия в содержании PolyP между штаммами WT и $\Delta ppn1$ в использованных условиях культивирования оказались невелики, в то время у штамма $\Delta ppn2$ наблюдали увеличение содержания более высокополимерных PolyP3 и снижение содержания более низкополимерных PolyP1 и PolyP2 (табл.). Электрофорез показал, что средняя длина цепи увеличилась только во фракции PolyP1 для штамма $\Delta ppn1$. Таким образом, увеличение содержания более длинноцепочечных PolyP характерно для обоих мутантов, хотя и не в одинаковой степени.

Мутанты были более устойчивы к марганцевому и перекисному стрессам. I_{50} для марганца составила 1 мМ для WT, а для обоих мутантов – 4 мМ. В присутствии 2,5 мМ перекиси рост штамма WT был подавлен полностью, тогда как рост двух мутантов – только наполовину. Мы предполагаем, что это связано с увеличением содержания длинноцепочечных PolyP, которые способны детоксифицировать ионы марганца путем комплексообразования, а также являются антиоксидантными факторами.

В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу концепции об участии полифосфатов и ферментов их метаболизма в стрессовой адаптации дрожжей.

Литература

1. Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A. (2001) The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, Proc Natl Acad Sci U S A 98(15):8542-8547.
2. Gerasimaité R. & Mayer A. (2017) Ppn2, a novel Zn²⁺-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. J Cell Sci 130(9):1625–1636.
3. 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.

Структура и функции фосфонатазных оперонов у бактерий-деструкторов глифосата рода *Achromobacter*

Свиридов А.В.¹, Эпиктетов Д.О.¹, Тарлачков С.В.^{1,2}, Петракова М.П.¹, Леонтьевский А.А.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
alhummen@rambler.ru

² Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38703

Ключевые слова: органофосфонаты, глифосат, фосфонатаза, оксидоредуктаза, оксигеназа, биодеградация, опероны.

Органофосфонаты (ОФ) – соединения, содержащие прямую ковалентную связь углерод-фосфор ($C-P^{3+}$), отличающиеся большой химической стойкостью и широко представлены в живой природе, выполняя функции антибиотиков, компонентов мембран, запасных веществ и т.д. Наиболее распространенный ОФ – 2-аминоэтилфосфоновая кислот (2-АЭФ) может составлять основную фракцию биодоступного фосфора в ряде экосистем. Деструкция 2-АЭФ путем переаминирования с образованием фосфоноацетальдегида трансаминазой PhnW и последующим гидролизом C–P связи фосфонатазой PhnX – важный механизм получения ортофосфата (P_i) бактериями. Фосфонатазный путь кодируется опероном *phnSTUVWX* (где *phnSTUV* – гены транспортных белков), экспрессия которого зависит либо от концентрации экзогенного P_i , либо контролируется белком-сенсором субстрата (2-АЭФ) семейства LysR. Феномен индукции синтеза фосфонатазы синтетическим гербицидом глифосатом (ГФ) вместо 2-АЭФ был ранее обнаружен нами у ряда бактерий-деструкторов ОФ, относящихся к родам *Achromobacter* и *Ochrobactrum* [1]. С помощью полногеномного секвенирования мы выявили необычную структуру фосфонатазных оперонов штаммов *A. insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16, выделенных из одного и того же сайта многолетнего загрязнения почв ГФ на территории Краснодарского края. У них отсутствует ген трансаминазы *PhnW*, однако присутствуют гены двух неизвестных белков, предварительно аннотированных как флавиновая оксидоредуктаза HpnW и фосфогидролаза PhnHD с неизвестными функциями. Определение роли указанных гипотетических ферментов деградации ОФ, а также изучение распространенности фосфонатазных оперонов с подобной организацией среди почвенных бактерий представляют значительный фундаментальный и прикладной интерес.

Анализ геномов бактерий-деструкторов ОФ, выделенных из сайтов загрязнения различными ксенобиотиками, показал, что фосфонатазные опероны нового типа (рис. 1) обнаруживаются как у штаммов, выделенных под селективным давлением метилфосфоната из почв Саратовской области, так и под селективным давлением ГФ из почв Краснодарского края вне зависимости от таксономического вида (*A. insolitus* или *A. aegrifaciens*). Гипотетические белки относительно консервативны: HpnW штаммов

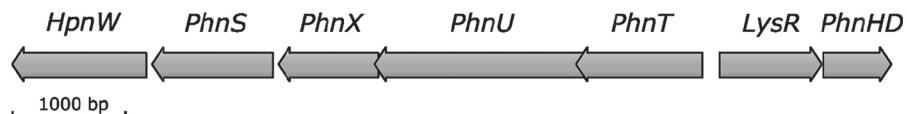


Рис. 1. Организация фосфонатазных оперонов у бактерий-деструкторов ОФ рода *Achromobacter*. *PhnSTU* – гены транспортных белков; *PhnX* – фосфонатаза; *HpnW* – гипотетическая оксидоредуктаза; *PhnHD* – гипотетическая $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -диоксигеназа; *LysR* – сенсор субстрата/активатор транскрипции

A. aegrifaciens MPS 12 и MPS 12A из Саратовской области имели одну аминокислотную замену относительно представителей этого же вида из Краснодарского края (Pro346Thr). То же справедливо для белков PhnHD из тех же организмов (Ser36Ala). Адаптированность штаммов к росту на ГФ не зависела от появления мутаций в генах фосфонатазного оперона относительно дикого типа.

На основе векторов pET-22b и штамма *E. coli* BL21(DE3) были созданы экспрессионные конструкции и получены суперпродуценты HpnW и PhnHD штаммов *A. insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16. Отработаны схемы культивирования, дезинтеграции и очистки, позволившие выделять указанные белки в электрофоретически гомогенном состоянии в растворимой форме. Отмечена склонность белков PhnHD к необратимой агрегации в высоких концентрациях; с учетом активного сверхсинтеза данного белка при внесении даже следовых количеств индуктора IPTG, время культивирования штамма-продуцента составляет не более 5 часов при температуре 28 °C.

Для рекомбинантных белков HpnW показано наличие кофактора FAD, связанного нековалентно и десорбировавшегося при инкубации в присутствии 1% SDS в течение 1 мин. Отмечен необычный сдвиг максимумов оптического поглощения холофермента в коротковолновую область относительно максимумов свободного кофактора. Белки проявляли чувствительность к ионной силе раствора; при низкой осмолярности происходила спонтанная денатурация с частичным высвобождением FAD. Хлорид натрия в концентрации от 100 mM стабилизировал HpnW; 10–50% глицерол оказывал криопротекторное действие, предотвращая денатурацию белка при замораживании. В присутствии 300 mM NaCl и 10% глицерола HpnW сохранял оптические свойства холофермента в течение 30 мин с 3% SDS при 30 °C.

Для определения возможных субстратов новых белков проводилось моделирование *in silico*, сравнение полученных моделей со структурами известных из литературы гомологов и молекулярный докинг с помощью инструментов IntFOLD, FunFOLDQA, Softberry 3D-Match и Geneious Pro. Гомологии аминокислотных последовательностей и предсказанных структур белков HpnW с известными ОФ-деградирующими оксидоредуктазами не выявлено. Наиболее вероятные субстраты фермента – ацетиламиноацетат и диметилглицин, весьма схожие по структуре с ГФ за исключением фосфоновой группы. Интересно, что эти же соединения указываются как вероятные субстраты при аналогичном анализе первичной последовательности ГФ-оксидоредуктазы – важнейшего фермента деструкции ГФ.

Отмечено высокое сходство PhnHD с новыми металлоконденсирующими диоксигеназами морских прокариот TmpB и PhnZ [2] как с точки зрения идентичного расположения аминокислотных остатков, обеспечивающих связывание субстрата и хелатирование ионов железа в консенсус-последовательности, так и по предсказанной структуре активного центра. PhnHD отнесенны к малоизученной кладе PhnZ-подобных диоксигеназ TIGR03276 в рамках суперсемейства HDc. Представители клады отличаются от HD-фосфогидролаз как по классу (оксидоредуктазы), так и по ассоциированности соответствующих генов с ОФ-деградирующими оперонами. Наиболее вероятный субстрат PhnHD – 1-гидрокси-2-аминоэтилфосфоновая кислота (ГАЭФ). Присутствие данного соединения в наземных экосистемах не описано, его возможные источники в сайтах выделения изученных бактерий неясны. Полученные данные указывают на наличие у ахромобактеров альтернативного варианта фосфонатазного пути, специализированного для деградации не 2-АЭФ, а иных аминоалкилфосфонатов, структурно схожих с ГФ, в силу чего последний и выступает индуктором фосфонатазного оперона у описываемых бактерий. Дальнейшие исследования предполагают определение специфики новых ферментов в отношении ГФ, 2-АЭФ и других ОФ; в случае PhnHD также потребуется отработка метода синтеза ГАЭФ в условиях лаборатории в связи с коммерческой недоступности последнего.

Изучение новых оксидоредуктаз в составе фосфонатазных оперонов *A. insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16 выполнено при поддержке гранта РНФ 23-24-00152.

Литература

- Свиридов А.В., Ермакова И.Т., Шушкова Т.В. Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А. Катаболизм органофосфонатов: биохимия и физиология бактерий-деструкторов и их взаимодействие в окружающей среде / Фосфорорганические нейротоксины (коллективная монография под ред. С.Д. Варфоломеева, Е.Н. Ефременко) // М.: РИОР. 2020. С. 253–285.
- Rajakovich L.J., Pandelia M.-E., Mitchell A.J., Chang W.-C., Zhang B., Boal A.K., Krebs C., Bollinger J.M.Jr. A new microbial pathway for organophosphonate degradation catalyzed by two previously misannotated non-hem-iron oxygenases. Biochem. 2019. V. 58. P. 1627–1647.

Изучение метаболизма фосфолипидов мицелиальных грибов и дрожжей методами липидомики

Сеник С.В.¹, Манжиева Б.С.¹, Амигуд Е.Я.^{1,2}, Хакулова А.А.³,
Серебряков Е.Б.³, Котлова Е.Р.¹

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

² Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена

³ Санкт-Петербургский государственный университет
senik@binran.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38704

Ключевые слова: липиды, липидомика, базидиомицеты, дрожжи.

Базидиальные грибы считаются наиболее высокоорганизованной группой грибов, тем не менее, представители этого обширного класса хранят в себе генетическую информацию о примитивных путях метаболизма липидов, иногда проявляющуюся только в определенных условиях, адаптация к которым, по всей видимости, играла решающую роль в процессе эволюции этих таксонов. Биосинтез глицеролипидов – ключевое звено в пролиферации клеток, тем не менее, метаболизм липидов грибов изучается на очень ограниченном круге объектов – главным образом, на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, а также на нескольких мицелиальных грибах рода *Aspergillus*, *Neurospora* и некоторых других. Однако особенности липидного метаболизма дрожжей *S. cerevisiae*, на которых проведена большая часть исследований, значительно отличает их от всех высших грибов, в частности, они не содержат типичных для грибов глюкоцилцерамидов (Dickson, Lester, 1999) и стерилглюкозидов (Grille et al., 2010), в их геномах отсутствуют гены синтеза бетаниновых липидов. Становится очевидным, что наши представления о путях биосинтеза и регуляции липидов не охватывают всего существующего разнообразия. Можно предположить, что регуляторные механизмы, координирующие пути синтеза глицеролипидов, существенно различаются у дрожжей *S. cerevisiae*, типичных базидиальных ксилотрофов и таких представителей базидиомицетов, как, например, олеогенные базидиальные дрожжи.

Синтез основного мембранныго фосфолипида фосфатидилхолина (ФХ) в эукариотической клетке может осуществляться двумя альтернативными путями: с помощью присоединения ЦДФ-холина к ДАГ (путь Кеннеди) или посредством последовательного метилирования ФЭ (ЦДФ-ДАГ путь). Путь Кеннеди является основным способом синтеза ФХ у животных, тогда как в клетках дрожжей *S. cerevisiae* ФХ синтезируется преимущественно с помощью метилирования ФЭ (Choi et al., 2004).

Целью работы было определение структурного разнообразия фосфолипидов базидиальных грибов разных систематических групп и определение вклада альтернативных путей в биосинтез разных молекулярных видов ФХ. Объектами исследования послужили штаммы Коллекции культур базидиомицетов LE-BIN БИН РАН. Культуры выращивали на агаризованной среде на основе солодового экстракта.

Полученные данные свидетельствуют, что в клетках базидиальных грибов метаболизм глицеролипидов отличается от такового у *S. cerevisiae*. Так, реал-тайм ПЦР анализ показал, что гены ферментов пути Кеннеди экспрессируются в мицелии *Flammulina velutipes* значительно активнее, чем гены пути метилирования ФЭ. Кроме того, ингибитор пути Кеннеди, а именно, фермента холин-киназы, фарнезол тормозит развитие грибной колонии, в отличие от ингибиторов пути метилирования, что также свидетельствует в пользу преобладания пути Кеннеди и отличает базидиальные грибы от дрожжей *S. cerevisiae*.

Вместе с этим, с помощью методов липидомики на основе LC-ESI-QTOF-MS/MS и LC-ESI-QqQ-MS/MS было продемонстрировано, что профиль фосфолипидов большинства базидиомицетов, включая *F. velutipes*, на 60–80% состоит из молекулярных видов, этифицированных линолевой кислотой, в отличие от *S. cerevisiae*, богатого олеиновой кислотой. Мы предположили, что различия в молекулярном профиле фосфолипидов связаны с разным вкладом двух путей биосинтеза. Для проверки этой гипотезы активность двух альтернативных путей биосинтеза фосфатидилхолина была изучена в экспериментах с меченными дейтерием предшественниками на двух объектах, контрастных по фосфолипидному профилю – *F. velutipes* с доминирующей C18:2 жирной кислотой и *Irpeus lacteus* с преобладающей C18:1 жирной кислотой. Результаты этой работы показали, что активность пути Кеннеди значительно превосходит активность пути метилирования у обоих видов. Интересно, что небольшое увеличение включения меченых предшественников в путь метилирования наблюдалось на более поздних этапах развития культур. Данная работа расширяет представления о метаболизме фосфолипидов и ставит вопрос о функциях пути метилирования ФЭ у базидиальных грибов.

Исследование проводилось с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества».

Литература

1. Dickson R.C., Lester R.L. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1438. P. 305–321.
2. Grille S., Zaslawski A., Thiele S., Plat J., Warnecke D. The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog. Lipid Res.* 2010. 49. P. 262–288.

Культуральные, физиологические, биохимические свойства и полногеномное секвенирование двух штаммов, выделенных из отходов птицефабрики

Сенченков В.Ю.¹, Ляховченко Н.С.¹, Никишин И.А.¹, Чепурина А.А.¹, Поливцева В.Н.²,
Абашина Т.Н.², Делеган Я.А.^{2,3}, Богун А.Г.³, Соломенцев В.И.³, Соляникова И.П.^{2,4}

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет
senchenkov@bsu.edu.ru

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

³ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

⁴ Региональный микробиологический центр НИУ «БелГУ»

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38705

Ключевые слова: Компостирование, отходы, *Bacillus subtilis*, *Peribacillus frigoritolerans*.

Тенденции к демографическому и экономическому росту в развивающихся странах приводят к увеличению спроса на животные белки, в том числе и на мясо птицы [1]. По некоторым оценкам к 2028 году мировое производство мяса вырастет на 18% [1]. При этом прогнозируется увеличение отходов

производства мяса. Так, твердые отходы птицеводства, в том числе и помет, может быть причиной многих экологических последствий.

Проблема утилизации птичьего помета является актуальной, так как для его хранения используют большие территории, а срок его естественной деградации достаточно долгий. Кроме того, такие накопления отходов являются источником зловония и других финансовых затрат [2].

Одним из способов снижения риска и негативного воздействия отходов птицеводства является компостирование [1]. Компостирование предполагает биохимическое воздействие на органический субстрат различными микро- и макроорганизмами и условно подразделяется на три основных этапа: 1) мезофильное компостирование, в котором легкорастворимые соединения разлагаются с выделением тепла; 2) термофильное компостирование, которое наступает за счет нагрева компста, и при котором происходит деградация полисахаридов, белков и жиров, а также гибель семян некоторых растений и патогенов; 3) охлаждение или созревание – гумификация, стабилизация компста и затухание основных процессов [3]. Микробное участие осуществляется группами мезо- и термофильных аэробных микроорганизмов, которые обеспечивают гидролиз полимерных субстратов. Некоторые микроорганизмы обладают нитрифицирующей активностью.

Для увеличения активности положительной микрофлоры компостирования существует ряд коммерческих инокулятов, содержащих консорциумы некоторых видов микроорганизмов.

Таким образом, в качестве мер по снижению микробной обсемененности образуемого компста можно использовать дополнительное внесение активных форм микроорганизмов-антагонистов с дополнительными полезными физиологическими свойствами.

Целью данного исследования было изучение культуральных, тинкториальных, физиологических и биохимических свойств двух бактериальных штаммов, выделенных из отходов птицефабрики и поиск возможностей их применения в промышленности.

Микроорганизмы были выделены методом серийных разведений отходов птицефабрики на твердой питательной среде Луриа-Бертани. Получение чистых культур выполняли методом истощающего штриха по наибольшей активности дезамина на модифицированной питательной среде с добавлением 0,1 мл 0,5% р-ра индикатора бромтимолового синего. Видовая принадлежность определялась методом полногеномного секвенирования.

Определение культуральных, морфологических, тинкториальных, физиологических и биохимических свойств проведено согласно стандартным методам [4].

В итоге были получены 2 чистые культуры, обозначенные как A_{1.1} и A_{1.2}. С помощью секвенирования штамм A_{1.1} идентифицирован как *Peribacillus frigoritolerans*, штамм A_{1.2} – как *Bacillus subtilis*. Культуры были депонированы во всероссийской коллекции микроорганизмов как *P. frigoritolerans* BKM B-3700D и *B. subtilis* BKM B-3701D.

Выделенные изоляты являются палочковидными грамположительными спорообразующими бактериями. Штамм *P. frigoritolerans* BKM B-3700D подвижен, тогда как *B. subtilis* BKM B-3701D – неподвижный. Оба штамма охарактеризованы как факультативные анаэробы, нитратредуктазо-, каталазо- и оксидазо-положительные, гидролизующие желатин и альбумин, образуют аммиак. *B. subtilis* BKM B-3701D также гидролизует казеин и проявляет липополитическую активность.

P. frigoritolerans BKM B-3700D использует D-глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит и сорбит, цистеин, фенилаланин, дегидроксифенилаланин, изолейцин, глютамин и орнитин, но не фруктозу и лактозу, гистидин, тирозин, треонин, серин, норлейцин и лизин. *B. subtilis* BKM B-3701D использует D-глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, маннит, сорбит, тирозин, фенилаланин, дегидроксифенилаланин, изолейцин и лизин, и не использует фруктозу, гистидин, цистеин, треонин, серин, норлейцин, глютамин и орнитин. Не растут на бензоате натрия.

Антагонистическая активность изолятов была определена методом оценки зоны лизиса тест-культур. Оба штамма оказались не активны в отношении грамотрицательных тест-культур (исключение – *J. lividum* BKM B-3515),, но проявили активность в отношении ряда грамположительных тест-культур, например, штамм *B. subtilis* BKM B-3701D обладает значительным эффектом подавления роста культуры *J. lividum* BKM B-3515, засеянной штрихом.

Штамм *B. subtilis* BKM B-3701D проявил противогрибковую активность в отношении *A. unguis* BKM F-1754, *B. sorokiniana* BKM F-4006, *A. brassicicola* BKM F-1864, *P. vexans* BKM F-1193. *P. frigoritolerans* BKM B-3700D не активен только в отношении *B. sorokiniana* BKM F-4006.

Таким образом, из отходов птицефабрики были получены изоляты микроорганизмов, обладающих свойствами, которые могут быть применены для улучшения процесса компостирования, повышения скорости данного процесса, а также – обеззараживанию и нейтрализации отходов птицеводства

Литература

1. Chiarelotto M. et al. Composting organic waste from the broiler production chain: A perspective for the circular economy //Journal of Cleaner Production. – 2021. – V. 329. – P. 129717. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129717>.
2. Kacprzak M.J., Sobik-Szolytysek J. The opoka-rock in N and P of poultry manure management according to circular economy // Journal of Environmental Management. – 2022. – V. 316. – P. 115262. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115262>.
3. Ezugworie F.N., Igobokwe V.C., Onwosi C.O. Proliferation of antibiotic-resistant microorganisms and associated genes during composting: An overview of the potential impacts on public health, management and future //Science of The Total Environment. – 2021. – V. 784. – P. 147191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147191>
4. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетруса. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

Нарушение гомеостаза цистеина у штаммов *Escherichia coli* при обработке антибиотиками

Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь
lyubov-sutormina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38706

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антибиотики, цистеин, *Escherichia coli*.

В связи с ростом числа патогенных микроорганизмов с множественной устойчивостью к антибиотикам, актуальным является как отыскание новых антимикробных препаратов, так и новых подходов к усилению эффективности широко применяемых в настоящее время антибиотиков. Было показано, что ряд антибиотиков оказывают свое действие, индуцируя продукцию активных форм кислорода (АФК), которые, как известно, могут убивать бактерии, повреждая биологически важные молекулы, в первую очередь ДНК [1]. Предполагается, что усилить действие антибиотиков можно за счет стимулирования продукции АФК, либо подавления антиоксидантной защиты бактерий.

Аминокислота L-цистеин во всех живых клетках входит в состав большинства белков и является компонентом антиоксиданта глутатиона. В нормальных условиях концентрация цистеина поддерживается в клетках на низком уровне [2], однако, в условиях стресса его гомеостаз может нарушаться [3]. Повышение концентрации внутриклеточного цистеина представляет потенциальную опасность, поскольку цистеин, обладая высокой редокс-активностью, способен восстанавливать внутриклеточные ионы железа, способствуя образованию высокотоксичных гидроксильных радикалов в ходе реакции Фентона [2]. Помимо этого, цистеин может выступать в качестве источника АФК в реакциях аUTOокисления [2, 4]. Учитывая эти свойства цистеина, представляет интерес выяснить, как изменяется его внутриклеточное содержание при действии антибиотиков. Цель данной работы – исследование изменения уровня внутриклеточного цистеина (Cys_{in}) у *Escherichia coli* при действии антибиотиков хлорамфеникола (ХАМ) и ципрофлоксацина (ЦФ).

В экспериментах использовался штамм *Escherichia coli* BW25113 из коллекции Keio, а также штамм *E. coli* APEC L-5876, выделенный из птиц, больных колибактериозом. Патогенные штаммы *E. coli* APEC (Avian pathogenic *Escherichia coli*), обладая множественной устойчивостью к антибиотикам, пред-

ставляют значительную угрозу промышленному птицеводству во всем мире, приводя к значительной смертности птиц и огромным экономическим потерям.

Бактерии выращивали на богатой среде LB-Miller в колбах 250 мл на шейкере (37°C , 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, затем вносили антибиотик – ХАМ (25 мкг/мл) или ЦФ (10 мкг/мл) и инкубировали в течение 90 минут. Определение цистеина проводили по методу Gaitonde [5].

В отсутствие каких-либо добавок удельные скорости роста (μ) у BW25113 и L-5876 были близки по значению и в момент обработки антибиотиками составляли 1.4 и 1.2 ч^{-1} , соответственно. При действии ХАМ рост обоих штаммов ингибировался в одинаковой степени, падая примерно до 0.1 ч^{-1} . В то же время, если добавление ЦФ к BW25113 полностью подавляло рост и приводило к частичному лизису, то L-5876 был полностью устойчив к этому антибиотику.

Исходный уровень внутриклеточного цистеина (Cys_{in}) у штамма L-5876 был в 1.6 раз выше, чем у BW25113 и равнялся 0.24 ± 0.006 у BW25113 и $0.39 \pm 0.012 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ у штамма L-5876. В контроле через 30 минут культивирования концентрация цистеина в клетках BW25113 снижалась в 1.5 раза до $0.17 \pm 0.007 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ относительно начального уровня, и не изменялась у штамма L-5876. Обработка ЦФ в течение 30 минут увеличивала содержание Cys_{in} у лабораторного штамма в 1.65 раз и не влияла на его уровень у L-5876 в сравнении с контролем (рис. 1). В этих же условиях, добавление ХАМ способствовало увеличению концентрации внутриклеточного цистеина в 1.8 раз у BW25113 и только в 1.3 раза у L-5876 (рис. 1).

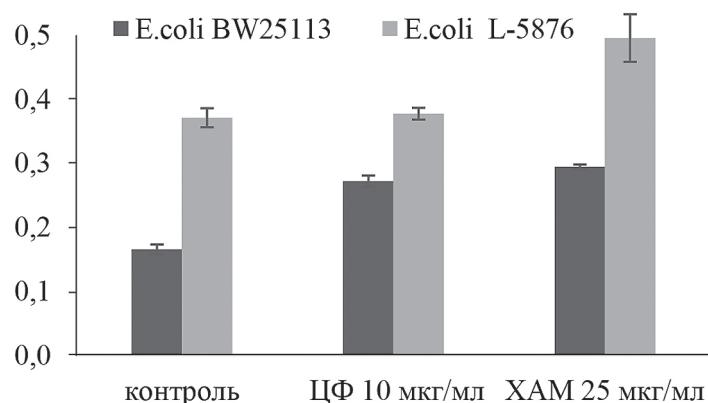


Рис. 1. Изменение уровня внутриклеточного цистеина у *E. coli* при обработке антибиотиками (представлены результаты через 30 минут после добавления антибиотика)

Таким образом, штаммы BW25113 и L-5876 (APEC) значительно различаются по уровню внутриклеточного цистеина и реакции на действие антибиотиков. Штамм BW25113 содержит значительно меньше Cys_{in} , чем L-5876, и в ответ на действие обоих антибиотиков, ингибирующих его рост, увеличивает уровень внутриклеточного цистеина. У L-5876 высокий уровень цистеина остается повышенным при обработке ципрофлоксацином, к действию которого этот штамм устойчив, и дополнительно увеличивается при ингибировании роста хлорамфениколом, ингибирующим его рост. Таким образом, во втором случае L-5876 ведет себя также как BW25113. Можно предположить, что одним из факторов, определяющих устойчивость штамма APEC к ципрофлоксацину, является повышенное содержание внутриклеточного цистеина. Наблюдаемые различия в действии двух антибиотиков могут быть связаны с тем, что ЦФ и ХАМ имеют различные молекулярные мишени. Требуются дальнейшие исследования роли внутриклеточного цистеина в устойчивости *E. coli* ответе к антибиотикам.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Литература

1. Kohanski M.A. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. 2007. V. 130(5). P. 797–810.
2. Imlay J.A., Park S. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 1942–1950.
3. 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. P. 1577–1592.

4. Imlay KRC. et al. The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 2015. – V. 197. – P. 3629–3644.
 5. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // Biochem. – 1967. – V. 104. – P. 627–633.
-
-

Влияние нокаутов генов полифосфатазы *PPN1* и полифосфатсингтазы *VTC4* на особенности роста на этаноле и полифосфаты митохондрий у *Saccharomyces cerevisiae*

Томашевский А.А.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
e-mail: tomashevskialexandr25@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38707

Ключевые слова: митохондрии, полифосфаты, *PPN1*, *VTC4*, окислительное фосфорилирование, *Saccharomyces cerevisiae*.

Неорганические полифосфаты (полиР) – линейные полимеры, содержащие от нескольких до нескольких сотен ортофосфатных остатков и выполняющие в клетке многочисленные функции. Одной из их функций, как соединений с фосфоэфирными связями, является участие в энергетическом обмене. Митохондрии дрожжей содержат собственный пул полифосфатов, однако пути участия этих полимеров в функционировании митохондрий у этих микроорганизмов изучены недостаточно. Ген *VTC4* кодирует основной фермент, обладающий полифосфатсингтазной активностью у дрожжей и синтезирующий полиР с использованием энергии АТФ. Ген *PPN1* кодирует фермент, обладающий экзополифосфатазной и эндополифосфатазной активностью и участвующий в регуляции метаболизма полифосфатов. Дрожжи остаются эффективной моделью для исследований в области энергетического обмена у эукариот. В настоящее время доступны коммерческие мутантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, что позволяет проводить исследования с использованием мутантов, содержащих стандартизованные генетические конструкции. Это особенно важно в связи с тем, что многие мутации у дрожжей обладают плейотропным действием, которое может зависеть от способа получения мутантов. Целью работы было выявление влияния нокаут-мутаций генов полифосфатсингтазы *VTC4* и одной из полифосфатаз *PPN1* на содержание полифосфатов и полифосфатазную активность в митохондриях *S. cerevisiae* и особенности роста мутантных штаммов на этаноле.

В отличие от изученного ранее мутанта с нокаутом гена *PPN1* (Sethuraman et al., 2001), штамм использованный в данной работе способен расти на этаноле, и более того, его рост не отличается от родительского штамма. Мутант с нокаутом гена *VTC4* демонстрирует некоторое замедление роста как на среде с глюкозой, так и на среде с этанолом.

У штамма с нокаутом гена *VTC4* содержание полифосфатов в митохондриях снижено на порядок, что свидетельствует о том, что большая часть полиР митохондрий синтезируется полифосфатсингтазой *Vtc4*. Ферментный комплекс, содержащий полифосфатсингтазу, присутствует не только в вакуолярной мембране, но и в мембране эндоплазматического ретикулума. По-видимому, основная часть полиР митохондрий у дрожжей доставляется из эндоплазматического ретикулума. У штамма с нокаутом гена *PPN1* содержание полифосфатов примерно на 30% больше чем у родительского.

У штамма изученного ранее наблюдалось значительное снижение экзополифосфатазной активности. Что бы проверить, воспроизводится ли этот эффект, была измерена экзополифосфатазная активности в митохондриях у родительского штамма и мутанта с нокаутом гена *PPN1*. Наличие активности удалось достоверно зафиксировать только у штамма дикого типа. Она составила 0.58 Е/мг белка.

При росте на этаноле содержание полифосфатов у штаммов одинаковое и примерно в два раза снижено в сравнении с данными при росте на глюкозе. Мы предполагали, что это снижение связано с гидролизом полифосфатов полифосфатазой Ppn1, которая присутствует в митохондриальной мембране. Однако в данной серии мутантов отсутствие полифосфатазы Ppn1 не оказалось существенного влияния на содержание полиР в митохондриях как при росте на глюкозе, так и при росте на этаноле.

При переходе клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование, у мутанта с нарушенным синтезом полиР наблюдается значительная задержка возобновления роста по сравнению с родительским штаммом. Данное наблюдение позволяет предположить, что полиР митохондрий являются значимым фактором при переключении метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Поэтому их нехватка, вызванная нарушением их синтеза, приводит к увеличению длительности лаг-фазы. Однако у мутанта с нокаутом гена *PPN1* задержка возобновления роста тоже наблюдается, хоть и не столь значительная. Известно, что Ppn1 регулирует не только количество полифосфатов, но и их длину цепи. Можно предположить, что для перехода на окислительное фосфорилирование важны полифосфаты митохондрий определённой, низкой длины цепи, образующиеся благодаря эндополифосфатазной активности Ppn1.

Можно заключить, что полифосфатсингтетаза Vtc4 ответственна за синтез основной части полиР митохондрий дрожжей. Ppn1 ответственная за всю измеряемую экзополифосфатазную активность митохондрий, однако, ее отсутствие не оказало существенного влияния на обмен полифосфатов в этих органеллах. Полученные данные не противоречат гипотезе об участии полиР митохондрий в переключении метаболизма между гликолизом и окислительным фосфорилированием.

Влияние замен Ser-911 и Thr-912 на функционирование РМА1 Н⁺-АТФазы и содержание полифосфатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Томашевский А.А., Петров В.В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
vpetrov07@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38708

Ключевые слова: полифосфаты, РМА1 Н⁺-АТФаза, плазматическая мембрана, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи

Неорганические полифосфаты (полиР), как и АТФ, являются одним из субстратов энергетического и фосфорного метаболизма, а также могут участвовать в фосфорилировании белков в бактериях и дрожжах. АТФ – главный компонент энергетического метаболизма и донор фосфата при фосфорилировании; предполагается, что АТФ может использоваться для синтеза полиР и наоборот. Следует отметить, однако, что взаимосвязь метаболизма АТФ и полиР и, в частности, влияние функционирования АТФазы на полифосфатный обмен остается мало изученным.

Функционирование АТФазы плазматической мембранны дрожжей (РМА1) и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы; при ее сбраживании фермент многократно активируется и происходит множественное регуляторное фосфорилирование молекулы РМА1 АТФазы по остаткам Ser и Thr. Глюкозо-зависимая регуляция активности Н⁺-АТФазы дрожжей в основном связана с фосфорилированием tandemно расположенных в С-концевом регуляторном домене остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до конца не установлена (Петров, 2023). Представлялось важным выяснить, есть ли связь между функционированием

АТФазы и метаболизмом полиР. Целью работы являлось изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков Ser-911 и Thr-912 в С-концевом участке H^+ -АТФазы плазматической мембраны на ее активность и фосфорный метаболизм на примере полифосфатов.

Были использованы мутанты, несущие точечные замены остатков Ser-911 и Thr-912 на нейтральный и нефосфорилируемый Ala (S911A и T912A) или на несущий заряд и потенциально фосфорилируемый Asp (S911D и T912D). Предметом исследования были ростовые характеристики мутантов, содержание АТФ, активность АТФазы и распределение полиР по фракциям.

Для определения ростовых параметров и остальных характеристик использовали штаммы *S. cerevisiae* NY13, несущие единичные точечные замены S911A, S911D и T912D; вместо не обладавшего ванадат-чувствительной АТФазной активностью T912A использовали двойной мутант S911D/T912A. Все мутации, кроме S911A, заметно, в 2–3 раза, снижали скорость роста (табл. 1). Эти данные позволяют предположить, что внесенные мутации могут заметно влиять на энергетический/фосфорный обмен.

Чтобы оценить энергетическое состояние клетки, измеряли содержание АТФ. В случаях S911A и T912D содержание АТФ не изменялось, зато в случаях S911D и S911D/T912A содержание АТФ уменьшалось в 2–2.5 раза (табл. 1). Сама активность РМА1 АТФазы при этом не влияла на уровень АТФ. Различие в действии мутаций на содержание АТФ может свидетельствовать о необратимом фосфорилировании остатка Asp-911 в мутантах S911D и S911D/T912A в отличие от Asp-912 в мутанте T911D; в последнем случае мутация не влияет на содержание АТФ, а сам замененный остаток, видимо, фосфорилируется обратимо – так же, как и присутствующий в ферменте остаток Ser-911. Несмотря на разницу в содержании АТФ и/или скорости роста, активность АТФазы мутантных штаммов S911D, T912D и S911D/T912A незначительно отличалась от таковой дикого типа; в случае S911A наблюдалось даже увеличение (табл. 1).

Таблица 1

Скорость роста, активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны, содержание АТФ и фракций полиР1 и полиР2 у штаммов *S. cerevisiae* S911A, S911D, S911D/T912A и T912D в % от данных родительского штамма

Штамм	Скорость роста	Активность АТФазы	Содержание АТФ	Содержание	
				ПолиР1	ПолиР2
S911A	112	142	103	137	70
S911D	35	99	55	48	140
T912D	47	84	98	55	113
S911D/T912A	53	94	40	61	135

Наиболее выраженное различие влияния мутаций в молекуле РМА1 АТФазы на фосфорный обмен наблюдалось при распределении полиР по фракциям у различных штаммов (табл. 1). Заметное перераспределение полиР по фракциям происходило у всех штаммов. В случае полиР1 доля этой фракции увеличивалась на 40% у S911A и уменьшалась на 40–50% в остальных случаях, где присутствовали Ser-911, замещающий его Asp-911 или Asp-912. В случае полиР2 происходит уменьшение на треть у аланиновой замены S911A и увеличение на 15–40% в остальных случаях, где присутствовала замена на Asp. Перераспределение фракций полиР у различных штаммов указывает на вовлеченность в этот процесс АТФазы и на связь между гидролизом АТФ и синтезом полиР, о чем свидетельствует различие в распределении фракций полиР1, находимой в цитозоле и вакуолях, и полиР2, частично ассоциирующейся с ядром, у штамма, несущего замену S911A, и у штаммов с аспартильными заменами (S911D, T912D, S911D/T912A).

В молекуле ферmenta имеются и другие потенциальные фосфосайты (Петров, 2023). Очевидно, для нормального функционирования РМА1 АТФазы и полифосфатного обмена необходимо наличие нескольких сайтов фосфорилирования, из которых главными являются Ser-911 и Thr-912; при удалении

этих фосфосайтов или их замене на фосфосайты другого типа (Ser/Thr→Asp) происходят масштабные изменения как в функционировании фермента (Lecchi et al., 2005, 2007), так и в энергетическом метаболизме в целом (Tomashevsky, Petrov, 2019, 2022).

Литература

1. Петров В.В. Влияние мутаций в экстракитозольном домене Н⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на ее активность и регуляцию. Микробиология. 2023. 92, 329–334.
2. Lecchi S., Allen K.E., Pardo J.P., Mason A.B., Slayman C.W. Conformational changes of yeast plasma membrane H⁺-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail. Biochemistry. 2005. 44, 16624–16632.
3. Lecchi S., Nelson C.J., Allen K.E., Swaney D.L., Thompson K.L., Coon J.J., Sussman M.R., Slayman C.W. Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation. J. Biol. Chem. 2007. 282, 35471–35481.
4. Tomashevsky A.A., Petrov V.V. Change in the yeast Pma1 H⁺-ATPase regulation causes redistribution of polyphosphates (PolyP). J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. 37, S1, 65–66.
5. Tomashevsky A.A., Petrov V.V. Point mutations in the different domains of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane PMA1 ATPase cause redistribution among fractions of inorganic polyphosphates. J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. 40, 635–647.

In vitro анализ трансляционной регуляции холин-эндолизинового оперона бактериофага Т5

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

¹ФГБУН филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биофизики клетки РАН)
svch2@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38709

Ключевые слова: холин, эндодолизин, промотор, транскрипция, трансляция.

Процесс лизиса грамотрицательных микроорганизмов бактериофагом, приводящий к высвобождению зрелого потомства, осуществляется группой фагоспецифических белков: холином, эндодолизином и спанинами. Холин – мембральноактивный белок, обеспечивающий сброс потенциала внутренней мембраны за счет олигомеризации и образования пор. Затем фермент эндодолизин проникает в периплазму и деградирует пептидогликан клеточной стенки. Спанины обеспечивают слияние внутренней и наружной мембран, завершая лизис. Регуляция времени лизиса – одна из важнейших задач фага, и осуществляется она чаще всего на уровне трансляции холина. Известно два способа регуляции тайминга для разнотипных холинов умеренного бактериофага λ и страбовируса T4. В обоих случаях важную роль играют вспомогательные белки – антихолины, различные у этих фагов по структуре и механизму действия. Лямбоидные холин и антихолин кодируются одним геном с двойным стартом трансляции, и регуляция происходит на уровне постепенного накопления «правильных» олигомеров холин-холин. Антихолин фага T4 – гетерологичный белок, являющийся структурным транс-регулятором.

У бактериофага T5 гены холина T4-типа (*hol*) и эндодолизина (*endo*) находятся в одном опероне последовательно, перекрывааясь на 2 п.н. Ранее нами был идентифицирован сильный конститутивный промотор холин-эндолизинового оперона фага T5 и установлена единственная точка начала транскрипции. Единственным стартовым кодоном трансляции гена холина оказался неканонический кодон TTG. Таким образом, ген холина лишен двойного старта трансляции; при этом в геноме фага T5 отсутствуют гомо-

логи антихолина. Было не ясно, каким образом регулируется время наступления лизиса бактериофагом T5. Учитывая силу промотора, мы предположили, что регуляция происходит на уровне трансляции отдельных генов оперона.

Целью данной работы было изучение регуляции холин-эндолизинового оперона бактериофага T5 на трансляционном уровне: анализ влияния природы стартового кодона, длины и состава транскрипта, а также областей инициации трансляции (TIR), включающих 5'-нетранслируемые участки и начала смысловых частей генов, на уровни экспрессии отдельных генов оперона.

Были созданы 13 химерных генетических конструкций на базе вектора pET28, которые содержали значимые фрагменты природных TIR эндолизина и/или холина, слитые с маркерным геном зелёного флуоресцентного белка (*egfp*) под контролем собственного промотора оперона. В число варьируемых фрагментов химер входили различные инициирующие кодоны (природный TTG холина, более эффективный ATG, терминирующий TAG); наличие/отсутствие перед маркерным геном 5'-концевых фрагментов TIR одного из генов длиной 51 п.н.; наличие/отсутствие перед вторым геном оперона предшествующего гена холина, полноразмерного или укороченного. В конструкциях с полноразмерным геном *hol* в силу токсичности его продукта инициирующий кодон TTG был заменён на терминирующий TAG. Серия конструкций содержала укороченный вариант гена *hol*, в котором был удален участок, кодирующий наиболее токсичный трансмембранный домен с 18 по 45 аминокислоту. Еще одна серия несла вариант гена *hol* «голова-хвост» в 1/4 природного размера.

Количественные уровни трансляции генов холина и эндолизина определяли, измеряя удельную флуоресценцию осветленных экстрактов клеток *E. coli* K12, трансформированных полученными химерными плазмидами. Влияние типа стартового кодона на уровень трансляции маркера под контролем природной TIR гена *hol* оказалось незначительным: при замене TTG на ATG она выросла всего в 1,4 раза. Однако, уровень экспрессии *egfp* под контролем TIR гена *endo* превысил уровень экспрессии *egfp* под контролем TIR гена *hol* в 20 раз. Максимальная флуоресценция наблюдалась в экстрактах клеток с конструкциями, содержащими редуцированный до 1/4 длины холин с полным сохранением TIR обоих генов, и составила величину порядка 15 000 ед/мг. Таким образом, уровень токсичного холина понижается за счет неэффективной инициации трансляции. Помимо инициации, на уровень экспрессии второго гена оперона влияла длина предшествующего транскрипта: флуоресценция, индуцируемая продуктами длинных транскриптов, была в 3–5 раз ниже максимальной. Одна из возможных причин – наличие фрагментов длиной 4–5 п.н., аналогичных последовательностям Шайно-Дальгарно (SD) и способных задерживать рибосомы при elongации. На протяжении гена холина находится 6 участков (G)AGGA/T,

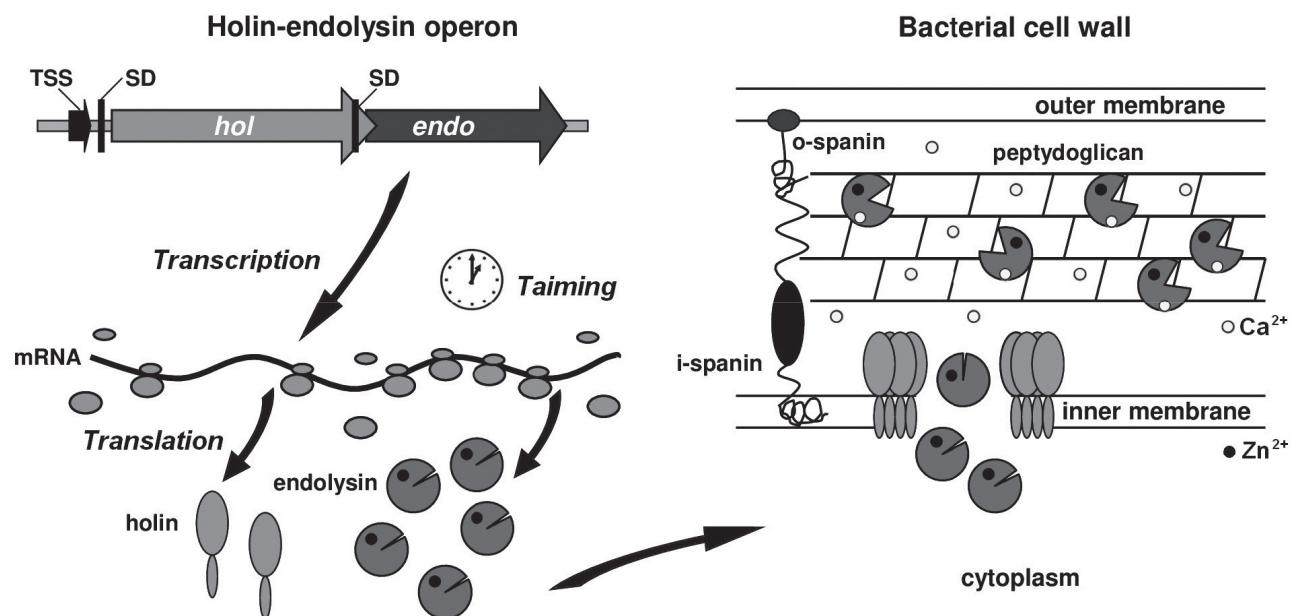


Рис. 1. «Тайминг» фаголизиса у бактериофага T5 на уровне трансляции генов холина и эндолизина. TSS – промотор оперона; SD – последовательность Шайна-Дальгарно

помимо 8-членной SD эндолизина в 3'-концевой области. Для сравнения, в гене эндолизина только один такой участок. Интересной находкой оказался также тот факт, что собственные TIR генов *hol* и *endo* в 7-8 раз более эффективны, чем TIR гена *egfp*. Судя по анализу потенциальной вторичной структуры мРНК, это обусловлено образованием прочных шпилек в системе pET28-*egfp*. Советуем другим исследователям, использующим флуоресценцию GFP, при создании экспрессионных плазмид с маркерным геном и особенно при сравнительном анализе флуоресценции обязательно учитывать потенциальную структуру образующейся рекомбинантной мРНК.

Таким образом, можно заключить, что регуляция тайминга лизиса клетки-хозяина бактериофагом T5 происходит на уровне инициации трансляции и отчасти элонгации мРНК генов оперона *hol/endo* и связана со скоростью накопления холина и эндолизина. Вторым аспектом регуляции тайминга является, вероятно, посттрансляционная активация эндолизина ионами кальция, происходящая в перiplазме бактериальной клетки (рис. 1).

Работа поддержана грантом РНФ № 23-24-00210.

СЕКЦИЯ 2

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Морфо-физиологическая характеристика и биотехнологический потенциал нового штамма *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w

Абашина Т.Н., Поливцева В.Н., Носков А.Е., Делеган Я.А.,
Антилова Т.В., Соляникова И.П., Сузина Н.Е.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
tnabashina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38710

Ключевые слова: *Streptomyces*, антимикробное действие, биопрепарат, фитопатогены

Биологическая защита растений от возбудителей является актуальным направлением в развитии органического сельского хозяйства. В качестве агентов биоконтроля развития фитопатогенных бактерий и грибов выступают микроорганизмы и их вторичные метаболиты, проявляющие антибактериальную и фунгицидную активность. Актиномицеты, являясь продуcentами разнообразных биологических соединений с различным действием (антибактериальным, противогрибковым и противоопухолевым), представляют собой перспективную группу для поиска новых штаммов. Среди актиномицетов наибольшую биотехнологическую значимость и, следовательно, интерес имеют представители рода *Streptomyces* [1–2].

Целью работы была изучение нового штамма IPS92w, выделенного из донных отложений реки Ока, для оценки его биотехнологического потенциала использования.

Морфология клеток штамма IPS92w является типичной для данной группы бактерий: воздушный мицелий представляет собой длинные ветвящиеся спороносные гифы. Воздушный мицелий штамма IPS92w в колонии организован в виде толстых разветвлённых волокнистых жгутов, толщиной 7–8 мкм, сформированными из тесно переплетённых между собой тонких нитей-гиф, толщиной 0,5–0,7 мкм. Поверхность спор гладкая.

На основании анализа полного генома штамма IPS92w был отнесен к *Streptomyces anthocyanicus*.

Изучение физиолого-биохимический свойств показало, что штамм IPS92w способен к росту в широком диапазоне значений температуры (10–37 °C), солености (0–9%) и pH (5–9).

Анализ на устойчивость к антибиотикам показал, что штамм IPS92w обладает высокой чувствительностью к антибиотикам, что дает возможность применять неразрушенные живые клетки в качестве биопрепарата.

Для изучения антимикробного действия штамма IPS92w применялся дискодиффузионный метод, основанный на оценке способности образовывать зоны ингибирования роста.

Культуральная жидкость штамма IPS92w подавляет рост грамотрицательных бактерий *Aeromonas veronii*, вызывающих инфекционное заболевание рыб, и *Pectobacterium carotovorum* B15 (широко распространённый опасный фитопатоген), а также грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus sphaericus* и *Kocuria rosea* VKM B-1236 и фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum* F-132 и *Pythium vexans* F-1193. Этилацетатный экстракт культуральной жидкости обладает более широким спектром подавления патогенов бактериального происхождения и грибов: грамотрицательных бактерий *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes faecalis* VKM B1518, *Pectobacterium carotovorum* B15, *Pantoea agglomerans* ATCC 27155, *Pseudomonas aeruginosa* ML 4262, грамположительных бактерий *Arthrobacter* sp. B52, *Bacillus cereus* GAST, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus mycoides* KBA4, *Kocuria rosea* VKM B-1236, *Staphylococcus aureus* St35 и фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum* F-132, *Pythium vexans* F-1193, *Asergillus unguis* F-1754, *Alternaria brassicicola* F-1864, *Penicillium gladioli* F-2088, *Botrytis cinerea* F-4549, *Pythium ultimum* F-4782.

Штамм *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w сохраняет свою способность подавлять тест-культуры не зависимо от состава среды и способа получения и подготовки вторичных метаболитов: сконцентрированная в 5 раз культуральная жидкость или экстракт органическим растворителем.

Таким образом, новый актиномицет *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w обладает ярко выраженным антимикробным действием против широкого спектра микроорганизмов, в том числе фитопатогенов. Широкие диапазоны значений условий для роста, высокая антибиотико-чувствительность, наряду со способностью подавлять рост ряда фитопатогенных бактерий и грибов, позволяют делать вывод, что данным штаммом может быть использован в качестве основы для разработки препарата для борьбы с заболеваниями растений.

Работа выполнена в рамках гранта Министерства высшего образования и науки, проект N 075-15-2022-1208.

Литература

1. Devi S.; Sharma M.; Manhas R.K. Investigating the plant growth promoting and biocontrol potentiality of endophytic *Streptomyces* SP. SP5 against early blight in *Solanum lycopersicum* seedlings. BMC Microbiol. 2022, 22, doi:10.1186/S12866-022-02695-8.
2. Minh N. Van; Woo E.-E.; Kim J.-Y.; Kim D.-W.; Hwang B.S.; Lee Y.-J.; Lee I.-K.; Yun B.-S. Antifungal Substances from *Streptomyces* sp. A3265 Antagonistic to Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology 2015, 43, 333–338, doi:10.5941/MYCO.2015.43.3.333.

Цитологические особенности нового изолята ультрамикробактерии *Microbacterium* sp. *Viol* – продуцента фиолетового пигмента

Абашина Т.Н.¹, Поливцева В.Н.¹, Звонарев А.Н.¹, Шорохова А.П.¹,
Носков А.Е.¹, Мачулин А.В.¹, Антипова Т.В.¹, Сорокин В.В.², 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 ФИЦ «Биотехнология» РАН

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38711

Из дерново-подзолистой почвы (окрестности г. Пущино) выделена новая грамположительная бактерия штамм *Viol*, которая по данным сравнительного морфометрического анализа клеточных популяций, выращенных на питательных средах различного состава, может быть отнесена к ультрамикробактериям

(УМБ) (Vitaly I Duda et al. 2020). По данным анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК новый изолят относится к роду *Microbacterium*, ближайшим филогенетическим родственником являются бактерии, принадлежащие к виду *M. chocolatum*.

Новый изолят характеризуется малыми размерами клеток с объёмом, не превышающим $0,1 \text{ мкм}^3$ (рис. 1б). Клетки шт. Viol имеют типичное для грамположительных бактерий строение клеточной стенки. Особенностью ультраструктурной организации клеток шт. Viol является наличие обширной капсулы, организованной в виде хаотически ориентированных на поверхности игольчатых ультраструктур (рис. 1в). На негативно окрашенных тотальных препаратах клеток методом высокоразрешающей трансмиссионной электронной микроскопии выявляются пакеты очень тонких кристаллов, ориентированных тангенциально по отношению к поверхности клетки. В клетках шт. Viol в области нуклеоида, как правило, присутствуют электронно-плотные гранулы сферической формы, которые в некоторых случаях заполняют значительный объём нуклеоплазмы клеток. По данным рентгеновского микроанализа в составе гранул детектируется фосфор и кальций. Возможно, эти внутриклеточные включения могут нести функцию ацидокальцисом (Jendrossek 2020).

Особенностью нового изолята *Microbacterium*, sp. Viol является способность продуцировать уникальный для этого рода пигмент интенсивного фиолетового цвета в процессе роста на агаризованной среде

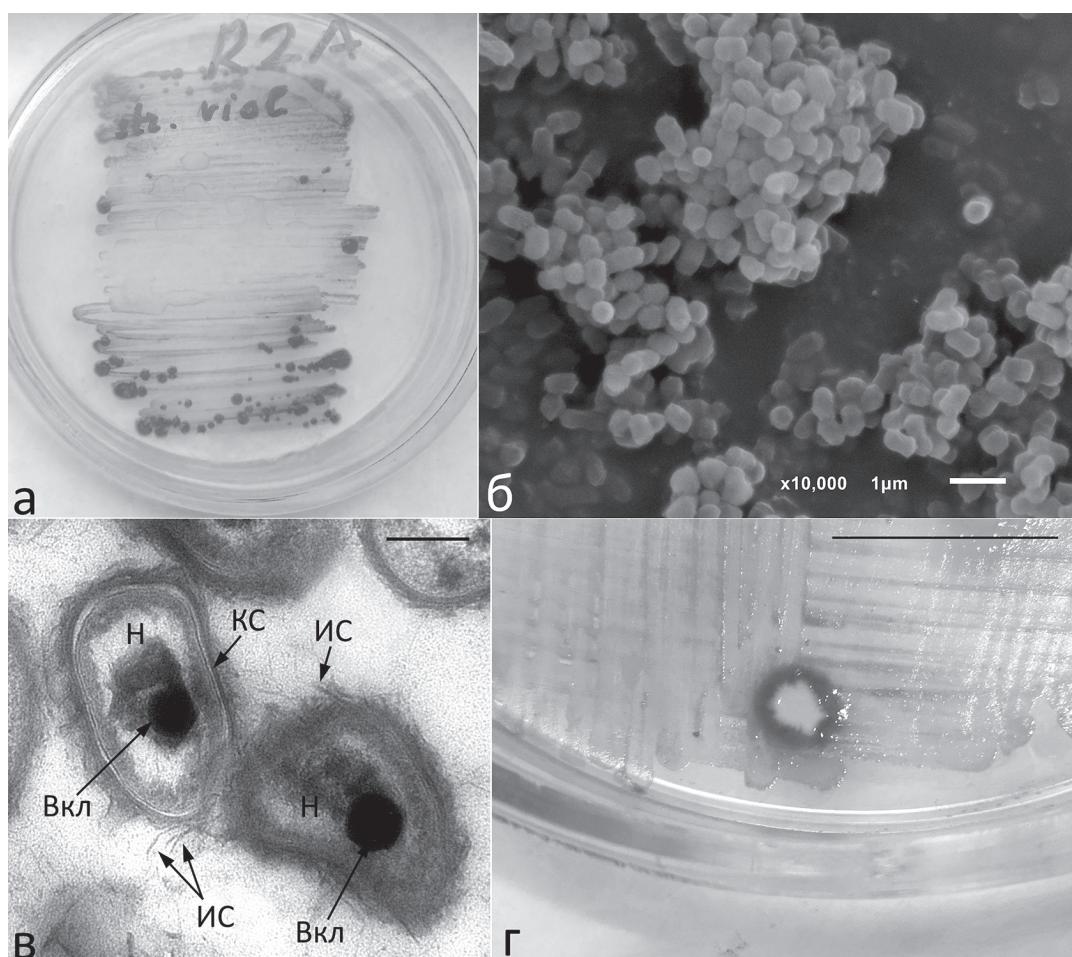


Рис. 1. (а) Интенсивно окрашенные фиолетового цвета колонии шт. Viol при росте на агаризованной среде R2A; (б) сканирующая электронная микроскопия клеток бактерии шт. Viol с характерными для УМБ малыми размерами; (в) трансмиссионная электронная микроскопия, ультратонкий срез клеток шт. Viol с уникальной организацией нуклеоида и наружной оболочки клеток в виде хаотически ориентированных структур, имеющих сходство с игольчатыми кристаллами; (г) блокирование роста колонии чужеродных бактерий клетками шт. Viol.

Обозначения: КС – клеточная стенка; ИС – поверхностные структуры игольчатой формы; Н – нуклеоид; Вкл – электронно-плотные включения в зоне нуклеоида.

Длина масштабной метки: в – 200 нм; г – 1 см

R2A (рис. 1а). Цвет пигmenta может меняться в сторону красно-фиолетового оттенка на более богатых средах. Пигмент прочно связан с клетками, не растворим в воде, слабо экстрагируется ацетоном и не экстрагируется спиртами (этанолом и метанолом). По этим характеристикам пигмент шт. *Viol* отличается от другого фиолетового пигmenta – виоласцеина (Lyakhovchenko et al., 2021).

Исследования с помощью традиционных микробиологических подходов (метод дисков) способности клеток шт. *Viol* оказывать антагонистическое воздействие на грамположительные и грамотрицательные бактерии, принадлежащие к различным родам и видам, не дали однозначных результатов. Однако было отмечено, что в некоторых случаях клетки нового изолята шт. *Viol* способны формировать кольцо вокруг колоний, блокирующее рост чужеродных бактерий (рис. 1г). Это свидетельствует о новом механизме межмикробного антагонистического воздействия, вероятно, являющимся более умеренной хищнической стратегией «волчья стая».

Литература

1. Duda V.I., Suzina N.E., Boronin A.M. Ultramicrobacteria. eLS. 2020.
2. Jendrossek D. Polyphosphate Granules and Acidocalcisomes. / In: Jendrossek, D. (eds) Bacterial Organelles and Organelle-like Inclusions. Microbiology Monographs, 2020. Vol 34. Springer, Cham.
3. Lyakhovchenko N.S.; Abashina T.N.; Polivtseva V.N.; Senchenkov V.Yu.; Pribylov D.A.; Chepurina A.A.; Nikishin I.A.; Avakova A.A.; Goyanov M.A.; Gubina, E.D.; Churikova D.A.; Sirotin A.A.; Suzina N.E.; Solyanikova I.P. A Blue-Purple Pigment-Producing Bacterium Isolated from the Vezelka River in the City of Belgorod // Microorganisms 2021, 9(1), 102.

Молекулярная диагностика микробиологического поражения иконы «Деисус из 13 фигур» из Государственной Третьяковской галереи

Авданина Д.А.¹, Башкирова К.Я.^{1,2}, Ермолюк А.А.¹, Манагарова О.Д.³, Колганова Т.В.¹,
Воробьева О.Б.⁴, Степанов М.Г.⁴, Шитов М.В.⁴, Жгун А.А.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва

² Московский политехнический университет, Москва

³ РосБиоТех, Москва

⁴ Государственная Третьяковская галерея, Москва

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38712

Ключевые слова: разрушение объектов культурного наследия, темперная живопись, грибы-деструкторы, реставрация, консервация.

Икона «Деисус из 13 фигур» из коллекции А.И. Анисимова, историка и реставратора древнерусской живописи, поступила на хранение в Государственную Третьяковскую галерею (ГТГ) в 30-х гг. прошлого столетия. Икона размером 215x59,5x4 см написана по традиционным северным канонам живописи конца 16 в. и представляет собой две липовые доски с горизонтальным направлением волокон, скреплённые тремя врезными встречными шпонками. Паволока на поверхности доски под красочным слоем находится не повсеместно, однако точно установлено, что она скрепляет стыковочный шов досок и находится ближе к кромкам. Техника исполнения: пигменты в яичной темпере и золочение. На лицевой стороне иконы до консервационных работ имелись внизу обширные следы копоти, утрат красочного слоя и левкаса, подтёков воды, размягчения древесины. Имелись следы микробиологического поражения в виде белесых пятен.

С разрешения заведующего отделом научной реставрации темперной живописи Третьяковской галереи М.В. Шитова с темперной поверхности иконы отобрали 15 микробиологических проб, в проблемных и контрольных областях. Пробы отбирали стерильными ватными палочками, ватный конец которых

резали и помещали в 1,5 мл микропробирки. Затем добавляли 1000 мкл раствора Maximum Recovery Diluent (г/л: пептонный перевар животной ткани – 2.0, NaCl – 17, pH = 7.0), инкубировали 4 часа при 26 °C, 230 г.р.м. Затем аликовты (100 мкл) инокулировали на 6 типов скошенных агаризованных сред: Чапек-Докс (CDA; г/л: сахароза – 30, NaNO₃ – 2, K₂HPO₄ – 1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄ · 7H₂O – 0.01, агар – 20, pH 7.0–7.4), Чапек дрожжевая среда (CYA; г/л: сахароза – 30, дрожжевой экстракт – 5, NaNO₃ – 0.3, K₂HPO₄ – 1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄ · 7H₂O – 0.001, ZnSO₄ · 7H₂O – 0.001, CuSO₄ · 5H₂O – 0.005, агар – 20, pH 7.0–7.4), среда картофельная с глюкозой (PDA г/л: настоящий картофель (200 г) – 4, глюкоза – 20, агар – 20, pH 5.6), среда с малтэкстрактом (MEA; г/л: малтэкстракт – 30, пептон – 5, агар – 20, pH 5.4), лизогенная среда для роста бактерий (LBA; г/л: бакто-триптон – 10, бакто-дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10, агар – 20, pH 7.5–8.0) и полная питательная среда для роста дрожжей (YPD; г/л: бакто-дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20, агар – 20, pH 6.5). Культивирование проводили в течение 15-ти суток при 26 °C. Для выросших 16-ти культур провели макро- и микроморфологический анализ. Микроморфологию анализировали методом световой микроскопии в нативных условиях на микроскопе Carl Zeiss Jena при х1000 увеличении. В 6-ти образцах обнаружили совместный рост бактерий и характерного доминантного мицелиального гриба. В остальных образцах обнаружили бактериальный рост. Для генотипирования из полученных культур выделили геномную ДНК, амплифицировали участки рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS1/ITS2), провели секвенирование по-Сенгеру. Для всех грибных образцов получили одинаковые последовательности (100% идентичности), относящиеся к аскомицету *Iodophanus* sp. В смешанных культурах также присутствовали представители типов Pseudomonadota (*Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*) и Bacillota (*Bacillus*).

Для определения роли *Iodophanus* sp. в биопоражении иконы «Деисус из 13-ти фигур» в отделе реставрации темперной живописи Третьяковской галереи изготовили макеты, содержащие основные материалы иконы: лиловую доску, на которую была наклеена пропитанная осетровым kleem паволока, затем нанесен левкас (грунт) и сделаны накраски с яичной темперой и осетровым kleem. На макеты инокулировали аликовты культур с *Iodophanus* sp., инкубировали 15 сут при 26 °C. В результате получили характерный рост, приводящий к лизису накрасок, и ранее наблюдавшийся в отдельных зонах изучаемой иконы.

В нашей работе показано, что на иконе «Деисус из 13-ти фигур» в нескольких независимых зонах наблюдается поражение доминантным грибом *Iodophanus* sp., способным к биодеструкции материалов иконы. Известно, что средой обитания гриба такого рода являются различные разлагающиеся целлюлозные субстраты, преимущественно ткань, а также бумага, газета, картон, дерево, навоз [2]. В большинстве исследований по биопоражению художественно-изобразительных материалов среди микроскопических грибов описаны представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* [1, 3]. Обнаруженный нами представитель семейства Pezizaceae – *Iodophanus* sp. достаточно редкий объект исследования на предметах искусства.

Учитывая древность иконы, её содержание в условиях церквей северной природы (Новгородская земля): перепад температур и изменение влажности в зимний период, копоть от свечей, оседание пыли и грязи, можно предположить, что биопоражение доминантным микроскопическим грибом распространялось на все полотно иконы. Это биопоражение, по-видимому, затрагивает, в том числе, соединительную ветошную ткань (паволоку), которая может являться своеобразным депозитарием для долгосрочного обитания гриба-деструктора. Более точно масштаб утрат внутренних составляющих иконы будет определен после ее рентгенографии. Выполненная в текущей работе микробиологическая диагностика иконы «Деисус из 13 фигур» важна для подбора таргетированного антисептика против обнаруженного грибадеструктора для ее дальнейшей реставрации и формулировки условий консервации.

Литература

1. Zhgun A.; Avdanina D.; Shumikhin K.; Simonenko N.; Lyubavskaya E.; Volkov I.; Ivanov V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. PLoS One 2020, 15, e0230591, doi:10.1371/journal.pone.0230591.
2. Cinto I.E., Dokmetzian D.A., Ranalli M.E. *Iodophanus carneus* and *I. testaceus* (Ascomycota-Pezizales): Independent taxonomic identity or synonymy? A study of their morphology and isozymes. Bol. Soc. Argent. Bot. 2007, 42, 181–187.
3. Mazzoli R., Pessione E. Ancient Textile Deterioration and Restoration: Bio-Cleaning of an Egyptian Shroud Held in the Torino Museum. In Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage; Joseph, E., Ed.; Neuchâtel, Switzerland, 2021; pp. 199–216 ISBN 978-3-030-69410-4.

Скрининг стрептомицетов с антимикробной и целлюлазной активностью

Боков Н.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого»

² Вятский государственный университет
nikita-bokov@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38713

Ключевые слова: стрептомицеты, целлюлазная активность, антагонизм.

Современная медицина и сельское хозяйство сталкиваются с постоянно растущей угрозой распространения микробных инфекций и проблемой антибиотической резистентности [1]. В свете этой проблемы поиск новых антимикробных соединений становится критически важным. Стрептомицеты – род бактерий, известных своей способностью к продукции антибиотиков. Кроме того большая часть его представителей участвует в круговороте углерода, перерабатывая целлюлозу и другие полимеры. Получение новых производителей ферментов целлюлазного комплекса, крайне востребовано в промышленной и пищевой биотехнологии [2]. В данной работе проводили скрининг на антимикробную и целлюлазную активность среди стрептомицетов, выделенных из почвы, отобранный на территории одного из медицинских учреждений Кировской области.

Для получения изолятов почву предварительно прогревали в течении 4 час при 70 °C. Посев из разведений почвенных суспензий (10^{-3} и 10^{-4}) производили на разные питательные среды: Гетчинсона, КАА, КГА [3]. Целлюлазную активность определяли в тесте с Конго красным, засевая микроорганизмы «уколом» на питательную среду Гетченсона с 1% КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза), учет результатов проводили на 10 сутки культивирования при 28 °C, измеряя диаметр зон разрушения КМЦ [4].

В результате наибольшая целлюлазная активность была выявлена у двух штаммов *Streptomyces* sp. B10 и B13, зоны деструкции которыми КМЦ, составили 35 и 45 мм соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Зоны разрушения КМЦ в тесте с Конго красным

Штамм	Б3	Б5	Б6	Б8	Б9	Б10	Б11	Б12	Б13	Б14	Б16	Б17
Зона просветления (мм)	0	27	0	22	0	35*	0	28	45*	20	30	15

Примечание: * отмечены наиболее выделившиеся штаммы в разрушении целлюлозы.

Антагонистическую активность штаммов проверяли по отношению к 6 фитопатогенным тест-бактериям и 7 тест-грибам. Тест-диски с антибиотиками рифампицин (5 мкг) и тербинафин (250 мкг) против бактерий и грибов соответственно использовали в качестве референса. Культуры стрептомицетов выращивали стационарно при 28 °C в течении 5 сут в жидкой овсяной среде. Для оценки их антагонистического действия выращивали тест-культуры фитопатогенных грибов и бактерий при 28 °C на скошенном агаре Чапека (7 суток) и среде RHM (2 суток) соответственно. Для посева получали суспензию для каждой из тест-культур, добавляя в пробирки по 5 мл стерильной воды, посев проводили газоном, на поверхность питательных сред раскладывали стерильные диски из фильтровальной бумаги (d – 5 мм), на которые наносили по 10 мкл жидких культур стрептомицетов. Учет результатов проводили, измеряя диаметр зон подавления роста тест-культур грибов и бактерий.

Наибольшую антагонистическую активность по отношению к бактериям продемонстрировал штамм *Streptomyces* sp. B13, подавляя рост 3 тест-бактерий. В среднем зона подавления составила 12,7 мм, что значительно больше, чем у остальных штаммов, поменьше, чем у тест-антибиотика канамицина

(25,2 мм). В отношении грибов единственным штаммом, который проявил антрафунгальную активность был *Streptomyces* sp. Б8. Референсный антибиотик при этом подавлял рост только гриба *F. culmorum* (табл. 2).

Таблица 2

Антагонистическая активность штаммов стрептомицетов

Тест-культуры бактерий:	Природные изоляты стрептомицетов												Рифампицин
	Б3	Б5	Б6	Б8	Б9	Б10	Б11	Б12	Б13	Б14	Б16	Б17	
	Диаметр зоны подавления роста (мм)												
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> 29r4	0	12	0	0	0	0	0	0	12	0	0	11	35
<i>Bacillus</i> sp. 29r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1A4	8	0	10	10	11	10	14	0	9	13	10	8	19
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> 3A5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
<i>Clavibacter michiganensis</i> H6	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>Erwinia rhamontici</i>	0	10	0	0	13	13	10	0	17	8	8	14	40
Среднее	1,3	4,5	1,7	1,7	4,0	3,8	4,0	0,0	6,3	3,5	3,0	5,5	25,2
Тест-культуры грибов:													Тербинафин
<i>Fusarium avenaceum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. moniliforme</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. proliferatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. culmorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>Alternaria</i> Я19/з	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Среднее	0	0	0	5,7	0	0	0	0	0	0	0	0	5

В целом можно говорить, что выделенные штаммы обладают как антагонистической, так и целлюлазной активностью, наибольший интерес на практике представляют штаммы, обладающие сразу двумя данными свойствами, к таким можно отнести штамм *Streptomyces* sp. Б13, который проявил одновременно целлюлазную и антибактериальную активность. Перспективна дальнейшая работа с этим изолятом и проведение комплексного изучения его биохимического потенциала и применимости на практике в качестве одного из компонентов биопрепарата для использования в сельском хозяйстве.

Литература

1. Мирошникова М.С. Применение антибиотиков в сельском хозяйстве и альтернативы их использования / М.С. Мирошникова, Е.П. Мирошникова, А.Е. Аринжанов, Ю.В. Киликова // Аграрный научный журнал. 2021. № 5. С. 65–70. – DOI: 10.28983/asj.y2021i5pp65-70.
2. Dennis B. Worthen, Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers // Journal of the History of Medicine and Allied Sciences. 2008. V. 63. № 2. P. 273–274. <https://doi.org/10.1093/jhmas/jrn016>
3. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егоров, Л.М. Захарчук. М.: Академия, 2005. 608 с.
4. Carder J.H. Detection and quantitation of cellulase by congo red staining of substrate in a cup-plate diffusion assay // Ann. Periodontal. Anal. Biochem. 1986. Vol. 153. P. 93–114.

Чувствительность к антибактериальным препаратам актинобактерий из почв разных функциональных зон (на примере Кировской области)

Гембицкая Е.А.¹, Широких И.Г.²

¹Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого
ekgemba@mail.ru

²Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН
irgen@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38714

Ключевые слова: антибиотики, актиномицеты, почвенный резистом.

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам является глобальной проблемой современности. Распространяясь быстрыми темпами, она создает угрозу не только в медицине, но и в сельском хозяйстве, животноводстве, ветеринарии и других отраслях. Гены устойчивости к антибиотикам стали достаточно распространеными на фоне сильного селективного давления антибиотиков в окружающей среде, а также вследствие влияния других факторов антропогенной деятельности [1, 2, 3]. Распространение в почвах антибиотикорезистентных бактерий обусловлено явлением горизонтального переноса генов у прокариот [4].

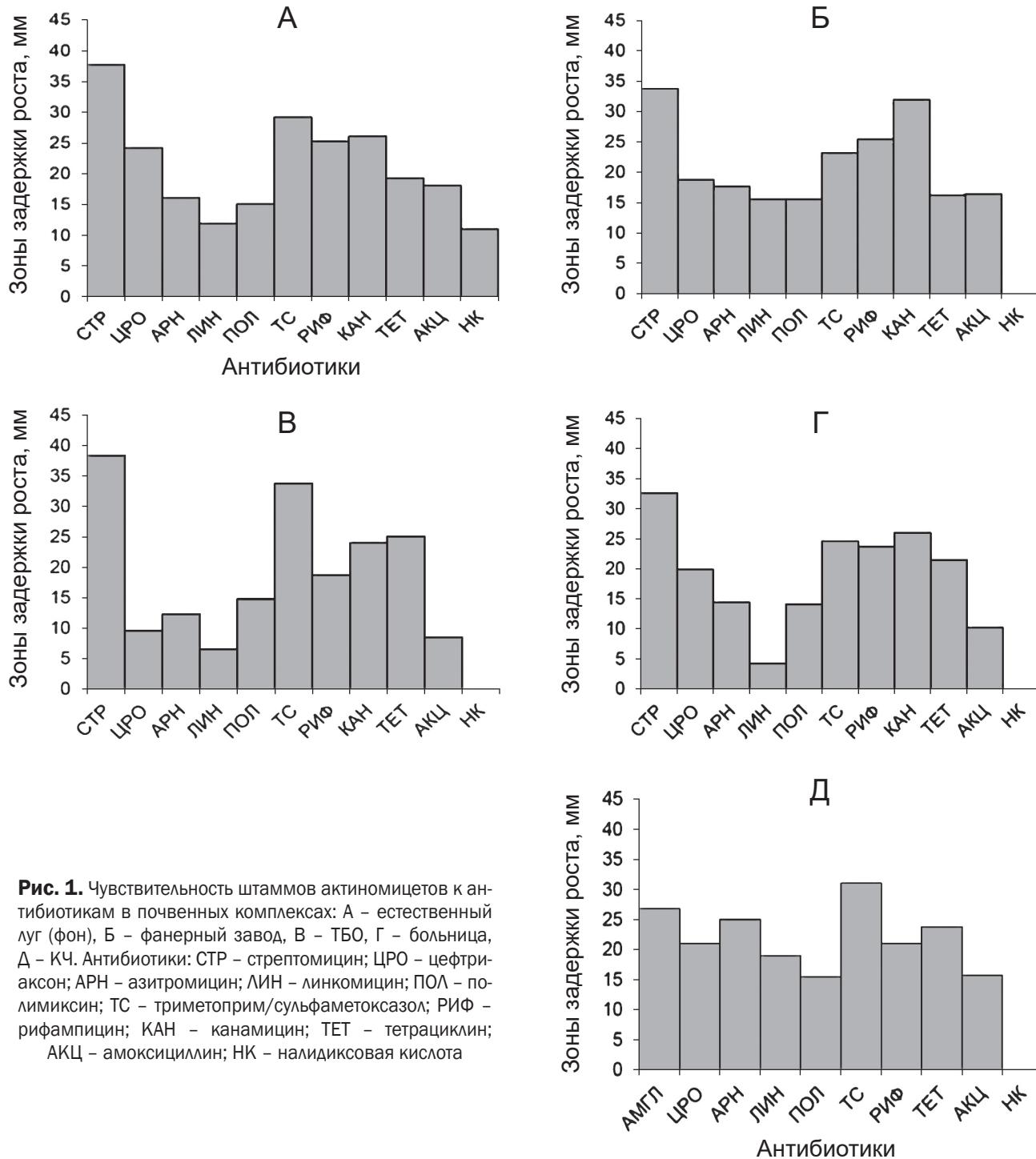
Цель работы – сравнение распространения чувствительности актиномицетов к антибактериальным препаратам в почвах, подверженных разным видам антропогенного воздействия, и в почве, расположенной вне зоны их влияния (фон).

В ходе работы было выделено в общей сложности 46 штаммов актинобактерий из почвенных образцов, отобранных на территории четырех разных функциональных зон муниципальных образований Мурашинского района: Мурашинский фанерный завод – МФЗ, больница п. Безбожник – Б, окрестность контейнера с твердыми бытовыми отходами – ТБО и естественный злаково-разнотравный луг п. Безбожник – БВ (фон), а также на территории бывшего хрестохранилища химического комбината в Кирово-Чепецком районе Кировской области – КЧ.

Чувствительность природных изолятов актиномицетов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в отношении 11 антибиотиков из основных классов: аминоглизиды (стрептомицин, канамицин), β-лактамные антибиотики (амоксициллин, цефтриаксон), хинолоны (налидиксовая кислота), сульфаниламиды (триметопrim/сульфаметоксазол), тетрациклины (тетрациклин),rifampицины (рифампицин), пептидные антибиотики (полимиксин), линкозамииды (линкомицин) и макролиды (азитромицин). Использовали диски индикаторные (НИЦФ, Россия, СПб) с антибиотиками в терапевтических концентрациях в соответствии с рекомендациями производителя. Чашки Петри помещали в термостат при 28 °C и инкубировали в течение 5 суток. Учет результатов проводили измерением диаметра зон задержки роста. Для выявления различий в чувствительности актинобактерий между фоновой почвой и почвами, подвергнутыми антропогенным нагрузкам, по результатам данных измерений были построены антибиотикограммы.

Анализ изменчивости зон ингибирования роста изолятов одним и тем же набором тест-антибиотиков позволил установить, что различные виды хозяйственной деятельности приводят к специфическим изменениям антибиотического резистома, характерного для почвы естественного злаково-разнотравного луга (фона) ().

У штаммов, выделенных с таких территорий, как ТБО и Б, наблюдалась меньшая чувствительность к азитромицину и линкомицину, чем у изолятов из почв с других территорий. У штаммов, выделенных из образца КЧ, отличавшегося высоким содержанием нитратов (260 мг/кг), гораздо ниже по сравнению с фоновой почвой была чувствительность к налидиксовой кислоте, амоксициллину и цефтриаксону.



Вместе с тем, были определены группы антибиотиков (хинолоны – налидиксовая кислота и β -лактамы – амоксициллин и цефтриаксон), чувствительность к которым у изолятов из всех исследованных почв, подверженных антропогенным нагрузкам, была значимо ниже, чем у почвенных изолятов с фоновой территорией. Не выявлено под воздействием разных видов антропогенного воздействия существенных изменений в чувствительности актиномицетов к аминогликозидам – стрептомицину и канамицину.

Полученные данные указывают на необходимость мониторинга распространения устойчивости к антибиотикам в почвах, не только подверженных риску накопления остаточных концентраций антибиотиков, но и иным последствиям антропогенных воздействий.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Структура и состояние компонентов техногенных экосистем подзоны южной тайги» (государственная регистрация в ЕГИСУ № 122040100032-5).

Литература

1. Kozhevina P.A., Vinogradova K.A., & Bulgakova V.G. (2013). The soil antibiotic resistome // Moscow University Soil Science Bulletin, 68(2), 53–59.
2. Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., & Сазыкина М.А. (2021). Влияние антибиотиков, использующихся в животноводстве, на распространение лекарственной устойчивости бактерий (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 57(1), 24–35.
3. Широких И.Г., Широких А.А., & Ашихмина Т.Я. (2018). Оценка антагонистического потенциала и антибиотической устойчивости актиномицетов, выделенных из двух желтоземов юго-восточного Китая. Почвоведение, (7), 859–867.
4. Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты, профилактика, диагностика, лечение. – 2011. – № 2 (42). – С. 4–13.

Роль психрофильных микробных сообществ железоредукторов и метаногенов в цикле железа в почвах Арктики

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.2023.17.38715

Ключевые слова: Арктика, железоредукция, метаногенез, микробные сообщества.

Зоны арктических и антарктических пустынь, высокогорье и тундру относят к постоянно холодным экосистемам. Арктические зоны представляют собой практически безлесную часть земной поверхности с близко залегающей вечной мерзлотой. Как показывают исследования, арктические отложения формировались в условиях низких величин окислительно-восстановительного потенциала и резким преобладанием двухвалентной формы железа над трехвалентной. Это свидетельствует о превалировании процесса восстановления Fe(III), который могут осуществлять железовосстанавливающие бактерии (ЖВБ) в составе микробных сообществ различных биоценозов Арктики. В свою очередь, микробные процессы железоредукции могут создавать благоприятные окислительно-восстановительные условия для развития метаногенных архей. Несмотря на растущее количество публикаций, в настоящее время, связь между циклами железа и метана остается до конца не выясненной.

Цель работы – выявить микробные процессы восстановления железа и образования метана в накопительных культурах, полученных из проб тундровой почвы, а также изучить возможную взаимосвязь этих процессов в условиях низких температур.

В работе использовали образцы двух почв подзоны арктической тундры, отобранных на п-ове Быковском: на вершине водораздела (урочище Мамонтовый Хайата) и в западной части лагуны Ивашкина, расположенных на губе Буор-Хая, в устье р. Лены.

Из различных горизонтов исследуемых почв были получены двадцать четыре накопительные культуры психрофильных бактерий, способных восстанавливать соединения железа при температурах культивирования 6 и 15 °C. В модельных экспериментах в качестве акцепторов электронов использовали синтезированный ферригидрит и растворимую соль железа в виде цитрата Fe(III). Количество восста-

новленного железа в накопительных культурах, полученных из образцов, отобранных в районе урочища Мамонтовый Хайата варьировало в широких пределах от 0.2 до 15.0 мМ. Максимальное количество двухвалентного железа было зафиксировано в накопительной культуре, полученной из образцов, отобранных в мерзлом дне разреза (2–4 см). В накопительных культурах, полученных из образцов почвы лагуны Ивашкина, концентрация ионов Fe(II) изменялась в пределах от 2.9 до 12.5 мМ. Максимум восстановленного железа определен в накопительной культуре, полученной из верхнего горизонта и выращенной с цитратом Fe(III) при температуре 15 °C.

Во всех накопительных культурах ЖВБ был исследован процесс метанообразования. Максимальные количества метана (11.6–12.0% CH₄) были обнаружены в накопительных культурах, полученных из верхних горизонтов почв в районе лагуны Ивашкина, где в качестве акцептора электронов использовали ферригидрит. Следует отметить, что количество ионов Fe (II) в данных накопительных культурах было минимальным. В накопительных культурах, где в качестве акцептора электронов использовали железо в виде растворимой соли, концентрация метана была значительно ниже (4.0–6.5%), либо процесс не был зафиксирован вовсе. Анализ накопительных культур, которые были получены из проб почв урочища Мамонтовый Хайата, показал наличие слабого процесса метанообразования (2.0–8.0%). В накопительных культурах, полученных из проб вечной мерзлоты, при всех вариантах температур и с разными формами Fe(III), процесс образования биогенного метана обнаружен не был.

Таким образом, в данном исследование нами впервые получены данные о взаимосвязи двух ключевых терминальных процессов, таких как железоредукция и метаногенез, в условиях постоянно низких температур. Максимальные количества CH₄ зафиксированы в накопительных культурах ЖВБ, в которых в качестве акцептора электронов было использовано трехвалентное железо в виде нерастворимых оксидов. В накопительных культурах, выращенных с цитратом Fe(III), который является более биодоступным для микробного восстановления, железоредукция ингибировала процесс метаногенеза. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что доступность железа в тундровых почвах Арктики является важнейшим фактором, регулирующим активность ЖВБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-00518.

Использование спектроскопии комбинационного рассеяния и SERS для обнаружения грибов-деструкторов произведений живописи

Калинин С.Г.^{1,2}, Мусаев А.Г.², Авданина Д.А.¹, Ермолюк А.А.¹, Волков И.А.², Жгун А.А.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Московская область, Долгопрудный

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38716

Ключевые слова: биодеградация произведений искусства, Рамановская спектроскопия, SERS, грибы-деструкторы.

Микроорганизмы способны разрушать многочисленные лакокрасочные материалы, используемые для создания произведений живописи [1, 2]. При этом одними из важнейших агентов биопоражения являются микроскопические грибы [1]. Для определения возможного микробиологического поражения наряду с традиционными микробиологическими методами в последние годы широко применяют генно-инженерные технологии, в том числе, метагеномное секвенирование экологической ДНК, выделенной из проблемных и контрольных зон [1]. Такие исследования совмещают с получением культур потенциальных деструкторов живописных материалов и определением их энзиматической активности с использованием макетов на основе этих материалов [1]. Это позволяет найти микроорганизмы, участвующие в том или

ином поражении и подобрать против них таргетированные антисептики [3]. Наряду с открывшимися возможностями по определению биодеструкторов, благодаря применению новых генно-инженерных технологий, трудоемкая пробоподготовка и высокая стоимость анализа не позволяют использовать их в качестве экспресс-методов диагностики. Кроме того, для получения достоверной информации требуется изначально некоторое минимальное количество отобранного материала, что не всегда возможно получить при диагностике объектов культурного наследия. Пробы, как правило, отбирают сухим ватным тампоном непосредственно с поверхности произведения живописи [1]. Этот наиболее щадящий метод отбора проб не позволяет отбирать микроорганизмы в его более глубоких слоях. В этой связи актуальной задачей является разработка новых неразрушающих высокочувствительных экспресс-методов диагностики. Одним из перспективных направлений видится использование Рамоновской спектроскопии и ее высокочувствительного варианта SERS (поверхностно-усиленная Рамановская спектроскопия, surface-enhanced Raman spectroscopy) для детекции биодеструкторов произведений живописи.

В нашей работе изучили возможность детектировать методами Рамоновской спектроскопии и SERS микроскопические грибы-деструкторы живописных материалов [1]. Для этого использовали штаммы *Mucor circinelloides* STG-30 (MK260195.1) и *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 (MW590700.1), изолированные с разрешения главного хранителя музеиных ценностей Государственной Третьяковской галереи Городковой Т.С. с поверхности иконы «Церковь Воинствующая» (1550-ые). На первом этапе разработали методику побоподготовки штаммов для спектральной диагностики. При исследовании методом SERS необходимо чтобы детектируемое молекулы находились на расстоянии до 10-ти нм от плазмонных структур. Для этого мицелиальные грибы инокулировали на агаризованную среду Чапека-Докса, часть которой затем удаляли для имплантации специальных подложек, необходимых для спектрального анализа (рис. 1).

При таком дизайне эксперимента инокулят разрастался за счет питательной среды, появляющиеся гифы спускались на пластину, которую затем извлекали и использовали для анализа. Первоначально работали с пластинами, на часть которых были нанесены плазмонные структуры серебра или золота (для проведения SERS) и другая была без них (для сравнительного проведения Рамановской спектроскопии). Однако растущий мицелий деформировал плазмонные структуры, что затрудняло анализ. Кроме того серебро оказалось токсично для изучаемых грибов. В результате изменили дизайн эксперимента, мицелий распространяли на пластины 4-х типов: на основе i) оксида аллюминия (Al_2O_3), ii) кремния (Si), iii) кварца (SiO_2) и iv) стеклотекстолита, фольгированного медью (Cu). Пластины на основе меди в дальнейшем не использовали, поскольку проявили токсичность, более высокую, чем ранее изученные пластины с серебряными плазмонными структурами. После обрастаия мицелием пластины извлекали, поводили Рамановскую спектроскопию. Затем, для исследования методом SERS, на поверхность мицелия

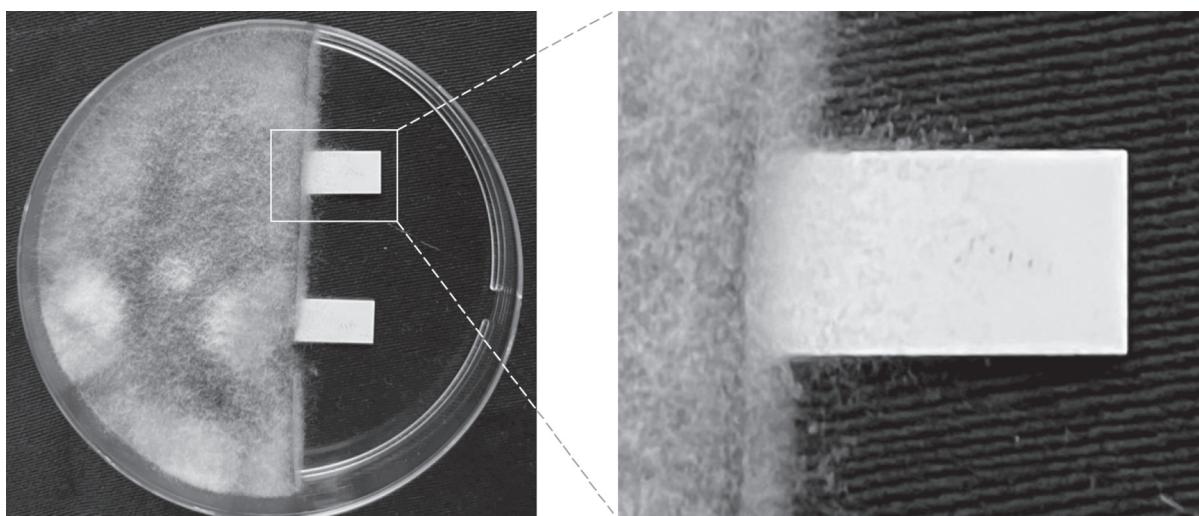


Рис. 1. Культивирования *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 на агаризованной среде Чапека-Докса, в которую имплантирована подложка с Al_2O_3 для последующего изучения методом Рамановской спектроскопии и SERS, 6 сут, 26 °C. При увеличении на правом рисунке видны мицелиальные гифы, растущие с питательной среды на аналитическую пластину

добавляли плазмонные наночастицы, представляющие серебряные нанопроволоки со средним диаметром 50 нм. Ag-нанопроволоки находились в коммерческом коллоидном растворе (на основе изопропанола, с добавлением пропиленгликоля, терpineола, глицерина), в котором не удалось провести измерения из-за высокого шума. В результате серии экспериментов удалось оптимизировать состав дисперсионной среды для нано-серебряных чернил, что позволило получить хорошее разрешение при проведении SERS. В результате проведённых исследований основным материалом выбрали пластины с Al_2O_3 . Это было связано с их доступностью, отсутствием бликов при проведении эксперимента, отсутствием фунгицидных свойств, слабых и непересекающихся с органикой линий КР спектра. Изначально грибы на поверхности пластин лиофилизировали с целью приблизить детектируемые молекулы к плазмонным структурам. Однако в дальнейшем отказались от этой процедуры в силу возникающих артефактов при повреждении клеток; исследования проводили в нативных условиях. При этом молекулы, которые детектировались при помощи SERS, такие как β-каротин, располагались на поверхности грибных клеток [4, 5].

Снятие КР-спектров производили на оборудовании DXR Raman Microscope производства Thermo Scientific. Подобрали оптимальные параметры для измерений: лазер 532 нм; его мощность 0.1 мВт; 50 мкм апертура; x50 объектив; 10 снимков с одной точки; длительность экспозиции одного снимка 1 сек. Основными критериями служили возможность проводить измерения различных образцов при одних и тех же параметрах без разрушения (карбонизации) органики; отношение сигнал/шум; возникновение флуоресценции. Характерное отношение сигнал/шум (ОСШ) для КР-спектров составило 10–15, в то время как для SERS-спектров удавалось получить ОСШ > 200.

Оптимизация условий пробоподготовки и спектрометрии позволило провести двумерное картирование участков с выросшими грибами на подложках. Картировали зоны, размером 30x30 мкм, с шагом 1 мкм. Такой подход позволил визуализировать в картируемой зоне участки с наибольшим содержанием интересующих соединений в составе мицелия и конидий (рис. 2).

Анализ показал наличие органических соединений, являющихся характерными вторичными метаболитами грибов. Так сравнение полученных спектров с литературными данными позволило установить, что в образцах STG-30 и STG-36 содержится β-каротин, с характерными пиками на 1003 см⁻¹ (дыхательная мода бензойного кольца), 1160 см⁻¹ (валентная деформация C-C) и 1518 см⁻¹ (валентная деформация C=C) [4,5]. Для STG-36 определили пики на 1584 см⁻¹, 1265 см⁻¹, 1347 см⁻¹, характерные для β-глюкана и хитина.

Также провели исследования динамики изменений SERS-спектров, регистрируемых в заданной точке выбранной структуры плесневых грибов, обусловленные ее конформационными изменениями при воздействии лазерного излучения КР-спектрометра (532 нм). Получили значимые изменения в спектрах, выражющиеся в постепенном снижении сигнала при воздействии в интервале 1–30 сек.

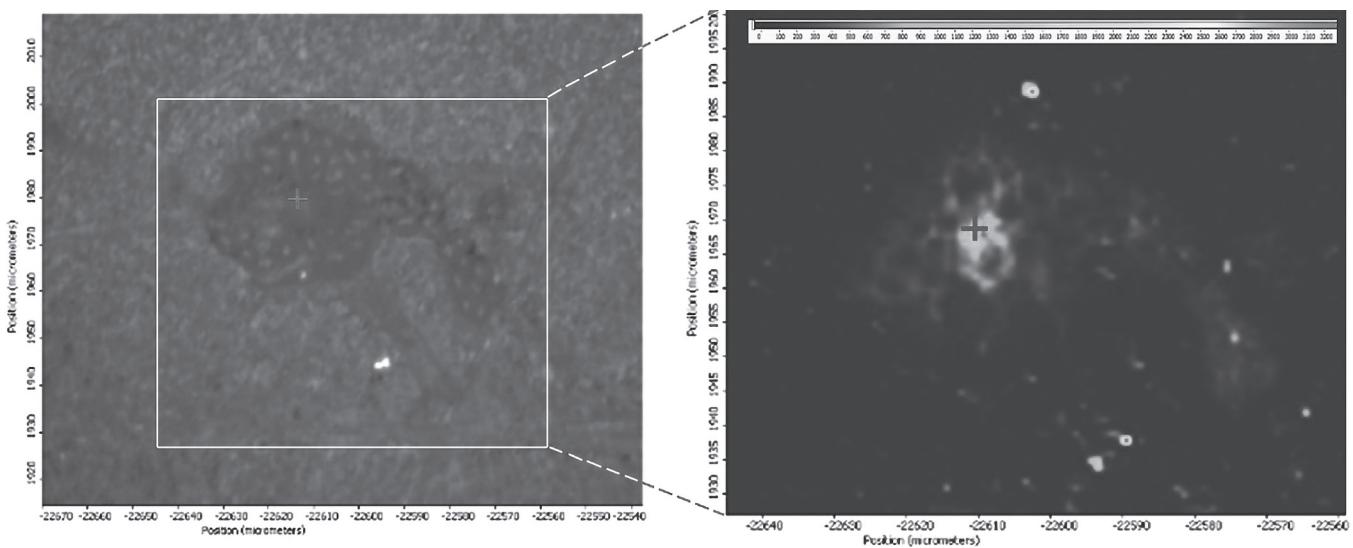


Рис. 2. Исследование *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 методом SERS. Слева – микрофотография области сканирования в поле светового микроскопа на подложке с плазмонной структурой. Справа – 2D-картирование по характерному пику КР

В наших экспериментах применение SERS (на адаптированных для нанесения плазмонных структурах) позволило повысить сигнал на 2–3 порядка по сравнению с Рамановской спектроскопией. Дальнейшая работа связана с оптимизацией условий измерения с целью дальнейшего повышения чувствительности метода. Полученные результаты важны для разработки неинвазивной экспресс-диагностики предполагаемого биопоражения объектов культурного наследия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 075-03-2023-106, идентификатор проекта 0714-2020-0007).

Литература

1. Zhgun A.; Avdanina D.; Shumikhin K.; Simonenko N.; Lyubavskaya E.; Volkov I.; Ivanov V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. PLoS One 2020, 15, e0230591, doi:10.1371/journal.pone.0230591.
2. Zhgun A.; Avdanina D.; Shagdarova B.; Nuraeva G.; Shumikhin K.; Zhuikova Y.; Il'ina A.; Troyan E.; Shitov M.; Varlamov V. The Application of Chitosan for Protection of Cultural Heritage Objects of the 15–16th Centuries in the State Tretyakov Gallery. Materials (Basel). 2022, 15, 7773, doi:10.3390/MA15217773.
3. Alexandrova L.A.; Shevchenko O.V.; Jasko M.V.; Solyev P.N.; Karpenko I.L.; Negrya S.D.; Efremenkova O.V.; Vasilieva B.F.; Efimenco T.A.; Avdanina D.A.; et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides. New J. Chem. 2022, 46, 5614–5626, doi:10.1039/D1NJ04312A.
4. Dzurendová S.; Shapaval V.; Tafintseva V.; Kohler A.; Byrtusová D.; Szotkowski M.; Márová I.; Zimmermann B. Assessment of biotechnologically important filamentous fungal biomass by fourier transform raman spectroscopy. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6710, doi:10.3390/IJMS22136710/S1.
5. Samuel A.Z.; Horii S.; Nakashima T.; Shibata N.; Ando M.; Takeyama H. Raman Microspectroscopy Imaging Analysis of Extracellular Vesicles Biogenesis by Filamentous Fungus Penicillium chrysogenum. Adv. Biol. 2022, 6, 2101322, doi:10.1002/ADBI.202101322.

Видовое разнообразие представителей рода *Neisseria* в генитальном тракте женщин и мужчин репродуктивного возраста

Карпунина Т.И., Оборин Д.А., Годовалов А.П.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера»
Минздрава России
AGodovalov@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38717

Ключевые слова: *Neisseria*, видовое разнообразие, генитальный тракт.

Первое описание представителей рода *Neisseria* было сделано в 1879 году Альбертом Найссером, а гено- и менингококки уже давно признаны патогенами человека. Накопленная к настоящему времени информация, в значительной степени благодаря достижениям в области секвенирования нуклеотидов, указывает на то, что род *Neisseria* гораздо более многочисленный, широко распространенный и разнообразный, чем считалось ранее, и включает в себя большое количество менее изученных видов. Более того, спорадические сообщения об изоляции и характеристике различных видов *Neisseria* показали, что это один из немногих бактериальных родов, который содержит представителей со спектром морфологии, включая бациллы и кокки (Bennett et al., 2013; Liu et al., 2015). Стало очевидным, что комменсальные виды нейссерий, населяющие слизистую носа и ротовой полости человека, явно преуспели в поиске ниш в ряде различных участков тела у широкого спектра хозяев (Liu et al., 2011), а *N. meningitidis*, как оказа-

лось, активно конкурируют с *N. gonorrhoeae*, обусловливая воспалительные заболевания в генитальном тракте (Retchless et al., 2018; Brooks et al., 2019; Nguyen et al., 2023).

Цель исследования

Оценить разнообразие *Neisseria*, колонизирующих репродуктивные органы, на фенотипическом и генетическом уровнях.

Материалы и методы

Исследовали отделяемое генитального тракта 49 человек с инфекционно-воспалительными заболеваниями, среди которых было 23 мужчины и 26 женщин, в том числе 19 человек с предварительным клиническим диагнозом «острая генитальная гонококковая инфекция» (ОГИ). Для бактериологического метода использовали кровяной и сывороточный агари, посевы на которых инкубировали при 37 °C в условиях эксикатора с повышенными влажностью и концентрацией CO₂. Идентификацию выделенных культур осуществляли по биохимическим признакам. Для секвенирования гена 16S рРНК применили платформу Illumina MiSeq. Использованы библиотеки 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina. Дополнительно детекцию *N. gonorrhoeae* осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты

Посредством бактериологического метода *N. gonorrhoeae* были выделены от 18 из 19 обследованных с предварительным диагнозом ОГИ, хотя с помощью ПЦР фрагменты генома гонококков были детектированы во всех случаях. *N. mucosa* изолировали из 59% образцов, *N. lactamica* – из 16%, *N. flava* – из 10%, *N. subflava* идентифицировали у трех обследованных, дважды были обнаружены *N. sicca* и *N. elongata*. При этом *N. mucosa* статистически значимо чаще встречались в женских образцах – в 73% против 43% у мужчин ($p = 0,042$). Кроме этого все изоляты *N. sicca* получены исключительно от мужчин. При оценке культуральных свойств установлено, что диаметр колоний варьировал от 1 до 2 мм, их поверхность была гладкой блестящей, типичной для S-форм. Изолируемые штаммы преимущественно формировали колонии серого цвета с разными оттенками от более светлого и желтоватого до темно-серого, коричневатого. Штаммы *N. mucosa*, *N. lactamica*, *N. elongata* более чем в 90% случаев обладали β-гемолитической активностью, однако диаметр зоны гемолиза превышал диаметр колоний лишь на 0,5-1,0 мм. Среди всех выделенных культур, вне зависимости от вида, некоторые образовывали колонии, плотно прикрепленные к подлежащей среде.

Итак, результаты культурального исследования указывают на присутствие в исследуемом материале различных нейссерий, при том, что эти таксоны традиционно считаются комменсалами ротовой полости и верхних дыхательных путей. Важно подчеркнуть, что ни в одном образце бактериологическим методом не были идентифицированы *N. meningitidis*.

При проведении метагеномного исследования неожиданным результатом явилось обнаружение в отделяемом генитального тракта генетических элементов *N. meningitidis* в 98% образцов. *Neisseria* sp. KEM232, которые согласно данным Kim et al. (2018) ранее выявленные в ротовой полости в зоне поражения зубов кариесом, обладающие схожими протеомными профилями с *N. elongata* (Sarkar et al., 2021), детектированы в 64% проб. *Neisseria* sp. 10023, демонстрирующие высокое сходство последовательностей генов 16S рРНК с *N. zalophi* CSL 7565T (97%), *N. wadsworthii* WC 05-9715T (97%) и *N. canis* ATCC 14687T (97%) – в 62% случаев, нередко обнаруживали *N. lactamica* (43%) и *N. elongata* (14%) – строго комменсальные виды носоглотки. Бактерии *Neisseria* sp. 10022 (21%), *N. subflava* (17%), *N. zoodegmatis* (17%), *N. weaverry* (12%), обитающие в различных экосистемах, таких как почвенный грунт, пресные и морские воды, растения и животные, а представители двух последних видов – считающиеся редкими зоонозными патогенами, обычно связанными с укусами собак или кошек, также оказались обитателями репродуктивных органов человека. Примечательно, что маркеры *N. gonorrhoeae* отмечены лишь в 21% случаев. При этом значимых различий в частоте встречаемости видов среди мужчин и женщин не установлено. В структуре всех нейссерий для мужчин и женщин статистически значимо различалась доля генов, принадлежащих *Neisseria* sp. KEM232 (10,2±2,4 и 4,8±1,3% соответственно; $p = 0,043$), *Neisseria* sp. 10023 (3,8±1,3 и 7,2±2,0% соответственно; $p = 0,041$) и *N. elongata* (0,01±0,01 и 1,6±0,6% соответ-

твенно; $p = 0,036$). Кроме этого в образцах от мужчин среднее число видов нейссерий на один образец было статистически значимо больше – $4,3 \pm 0,6$ (у женщин – $2,7 \pm 0,3$; $p = 0,022$), в единичных случаях детектировали 9–10 специфических видовых маркеров одновременно.

Обсуждение

Таким образом результаты бактериологического и предпринятого молекулярно-генетического исследования и их сравнительный анализ подтверждает широкую представленность различных видов *Neisseria* в генитальном тракте и женщин, и мужчин, хотя большая часть из них ранее обнаруживалась преимущественно в носо- и ротоглотке, верхних дыхательных путях. Al Suwayyid et al. (2021) выдвинули гипотезу, что *N. meningitidis* являются донорами профага Nf1 для *N. lactamica* и *N. gonorrhoeae*, приобретение которого усиливает их колонизационную активность, в то же время между колонизацией *N. lactamica* и *N. meningitidis* существует обратная зависимость. Также установлено, что геном *Neisseria* sp. 10023 кодирует факторы патогенности аналогичные другим представителям рода на 53–91%. Для этого таксона характерно расположение кокков поодиночке, парами и короткими цепочками, рост в средах с содержанием $NaCl$ до 4% и при pH от 6 до 8 (Zhang et al., 2019). Можно предположить, что подобные характеристики таксона 10023, как и целого ряда других изолятов, а также фенотипическая пластичность нейссерий, в частности, вариабельность и сходства по биохимическим признакам, затрудняют видовую идентификацию при лабораторной диагностике. Более того, широкий видовой спектр нейссерий, присутствующих в секретах репродуктивных органов, ставит под сомнение диагностическую значимость микроскопического метода, закрепленного в Клинических рекомендациях «Гонококковая инфекция» (2021), даже в подтверждении диагноза ОГИ у мужчин. Как и можно было ожидать, диагностическая чувствительность культурального метода диагностики гонококковой инфекции ниже, чем у методов, основанных на амплификации и секвенировании нуклеиновых кислот. Однако, классификация групп с помощью молекулярных методов запутана сочетанием их генетического сходства и обширного полиморфизма, наличием общих последовательностей и общего прародителя с горизонтальным генетическим обменом, в том числе они с трудом различаются друг от друга филогенезом 16S rPHK (Green et al., 2022), что на сегодняшний день не позволяет рекомендовать такой подход в практику изучения экологии и эпидемиологии *Neisseria*.

Микробное разнообразие донных отложений реки Каменка

Морозова Е.И., Егорова Д.О.

Пермский государственный национальный исследовательский университет
iekatierina.morozova.1999@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38718

Ключевые слова: бактериальное разнообразие, нефтяное загрязнение, донные отложения.

Река Каменка протекает по территории Кокуйского газонефтяного месторождения, расположенного в Пермском крае. На протяжении длительного периода времени в водах фиксируются нефтяные углеводороды, повышенное содержание хлоридов, а также присутствует запах сероводорода [2]. Через Каменку и сеть других ручьев и рек района нефтепроизводные и химреагенты попадают в Ирень, затем – в Сылву, а оттуда – в Каму. На сегодняшний день большая часть рек Кунгурского и Ординского районов подверглись нефтяному загрязнению. Люди вынуждены пить воду из «химических» рек, что приводит к постоянным болезням.

С учетом неизбежного глобального антропогенного влияния, все донные отложения в той или иной степени содержат загрязнения, и их следует считать природно-антропогенным образованием. Донные

отложения – это аккумулятор не только органического вещества, но и поступающих поллютантов, а том числе нефтяных углеводородов. Одними из показателей благополучия донного экотопа являются численность и соотношение групп гетеротрофных микроорганизмов и углеводородокисляющих бактерий.

Целью настоящей работы стало изучение состава микробиоценоза донных отложений реки Каменка, подверженных нефтяному загрязнению.

Объектами исследования стали четыре образца донных отложений реки Каменка Кунгурского района Пермского края (РФ), отобранные в 2021 году сотрудниками кафедры биогеоценологии и охраны природы ПГНИУ: V_00 – малозагрязненный пруд в истоке реки Каменка (выше скалы); V_00_1 – источник нефтезагрязненных вод под скалой. При источнике образован небольшой пруд в 10–15 м от V_00; V_DO_12 – сильно загрязненный пруд-отстойник (в 100 м ниже по течению от V_00_1); V_DO_22 – пруд в среднем течении реки Каменка (около 2500 м ниже V_DO_12), наполненный водами источника, бьющего из-под скалы. Также в исследовании были использованы эти же образцы, но только уже после проращивания на них семян клевера белого [3].

Методы исследования

В основе метода определения численности жизнеспособных клеток лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных, так называемых колониеобразующих единицах (КОЕ).

Рассев до чистой культуры был произведен при помощи бактериологической петли методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи.

Принадлежность бактерий к грамположительным или грамотрицательным определяли с помощью ускоренного теста. Исследуемую культуру бактерий с помощью петли переносили с твердой среды на предметное стекло в каплю 3%-го раствора КОН и тщательно перемешивали. Через 10 секунд петлю поднимают над каплей. Для грамотрицательных бактерий характерно образование слизи ДНК, которая тянется за петлей на 0,5–1,0 см. Если образование слизи не наблюдается, бактерии относятся к грамположительным. Образование слизи происходит в результате разрушения клеточных стенок грамотрицательных бактерий и выхода из них нукleinовых кислот.

Чистые культуры микроорганизмов были помещены в чашки Петри со средой K1, а также во флаконы объемом 12 мл с 2 мл соответствующей минеральной среды. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали бифенил. Инкубацию осуществляли 2–4 недели в термостате при +28 °C, либо на термокачалке (Environmental Shaker-Incubator ES-20/60, «BioSan», Латвия) (100 об/мин.) [1].

Штаммы микроорганизмов, полученные во флаконах со средой K1 и бифенилом, были помещены на чашки Петри, содержащие среду K1 со 150 мкл 5%-й бензойной кислоты. Таким же образом была проведена работа с 5%-й салициловой кислотой. Инкубацию осуществляли в ходе одной недели в термостате при +28 °C.

Статистическую обработку и графическое отображение результатов проводили при помощи Пакета анализа Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что численность бактерий в образцах донных отложений составила: $3,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в образце V_DO_12, $2,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в образце V_DO_22, $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в образце V_00_1 и $0,3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в образце V_00. Через 7 суток культивирования суспензии из данных образцов на среде LB, была описана морфология у 49 штаммов аэробных бактерий. Анализ выделенных штаммов показал, что в бактериоценозе донных отложений реки Каменка преобладают грамположительные штаммы (41 штамм из 46 выделенных). Установлено, что после проращивания клевера разнообразие выявляемых штаммов аэробных бактерий увеличилось. При морфологическом описании колоний было выявлено 74 разных морфотипа, из них 59 являлись грамположительными.

По результатам исследования способности выделенных 83 штаммов использовать в качестве источника углерода бифенил (ароматическое соединение, состоящих из двух бензольных колец, соединенных С–С связью) показано, что 39 штаммов росли в присутствии бифенила на плотной минеральной среде К1, а при культивировании в жидкой минеральной среде К1 рост был отмечен у 24 штаммов аэробных бактерий. Установлено, что данные 24 штамма способны использовать как ростовой субстрат также бензиную и салициловую кислоты, проявляя большую деструктивную активность к бензиной кислоте.

Таким образом, в составе микробиоценоза донных отложений реки Каменка присутствуют в значительном количестве аэробные бактериальные штаммы с гетеротрофным питанием, при этом часть из них проявляют деградативную активность к химическим ароматическим соединениям, не являющимся компонентами нефти.

Литература

1. Егорова Д.О. Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов: филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал: Автореф. Д-р.б. наук. Пермь, 2022. 358 с.
2. Егорова Д.О., Санников П.Ю., Хотяновская Ю.В., Бузмаков С.А. Состав бактериальных сообществ нефтезагрязненных донных отложений реки Каменка // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2023. Т. 78. № 1. С. 17–24. DOI 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-3.
3. Морозова Е.И. Влияние нефтяного загрязнения почвы на семена клевера белого // Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2023. С. 572–576.

Выделение и идентификация штаммов бактерий, устойчивых тяжелым металлам и антибиотикам, из осадков сточных вод г. Тулы

Сизова О.И.¹, Переломов Л.В.², Соколов С.Л.¹, Кочетков В.В.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» ИБФМ РАН
osizova@rambler.ru

²Тульский государственный университет им. Л. Толстого

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38719

Ключевые слова: тяжелые металлы, антибиотики, осадки сточных вод.

Антимикробные препараты и другие токсичные вещества, включая тяжелые металлы, часто обнаружаются в сточных водах лечебных учреждений, откуда попадают в городские сточные воды. Высокая органическая нагрузка и плотность бактерий в сточных водах создают идеальную среду для распространения устойчивости к антибиотикам [1]. Тяжелые металлы сами по себе или в сочетании с антибиотиками оказывают избирательное давление на микробы в очистных сооружениях, тем самым делая их устойчивыми как к тяжелым металлам, так и к антибиотикам [2]. Устойчивость к антибиотикам и появление мультирезистентных штаммов бактерий в сточных водах представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Цель нашей работы – выделить и идентифицировать бактерии, устойчивые тяжелым металлам из осадков сточных вод (ОСВ) г. Тулы разного возраста и выяснить, если ли у них корезистентность к антибиотикам.

Образцы осадков сточных вод с городских очистных сооружений г. Тулы были отобраны весной. В образцах определяли тяжелые металлы (ТМ) методом атомно-адсорбционной спектроскопии. В образцах ОСВ концентрации тяжелых металлов были значительно выше, чем в зональных почвах, однако, в соответствии с национальными стандартами, только осадок старше 6 мес. имеет ограничения в использовании в сельском хозяйстве из-за чрезмерных концентраций цинка и кадмия (табл. 1).

Таблица 1

Содержание тяжелых металлов в осадках сточных вод разного возраста (мкг/кг)

Металл	0 мес.	1 мес	6 мес	12 мес	5 лет
Co	28.6	28.8	27.9	30.4	309.0
Ni	66.8	33.3	72.3	50.1	69.0
Cu	228.4	171.1	269.2	272.2	102.6
Zn	1119.6	901.4	1791.2	1865.8	2360.8
Cd	8.7	2.9	10.8	4.0	33.0
Pb	38.0	27.1	37.4	27.6	60.0

Из образцов ОСВ были выделены штаммы, устойчивые к 3–5 мМ тяжелых металлов (Cu, Co, Ni, Pb, Zn, Cd). Отобранные штаммы были идентифицированы с помощью сиквенса гена 16SPHK. Затем штаммы были проверены на устойчивость к антибиотикам. Для этой работы были взяты антибиотики, представляющие разные группы и поколения: ампициллин, пенициллил, карбенициллин, амикацин, канамицин, гентамицин, неомицин, новобиоцин, стрептомицин, тетрациклин, хлортетрациклин, цфатоксим, цефтазидим, меропенем, триметоприм, хлорамфеникол, рифампицин. Проведенные исследования показали, что все штаммы имели устойчивость к нескольким антибиотикам (табл. 2). Мультиустойчивость к антибиотикам показали штаммы *Serratia fonticola* SS0-1C^{u,Pb}, *Stenotrophomonas maltophilia* SS0-5^{Zn,Cu}, *Stenotrophomonas maltophilia* SS0-10^{Pb,Zn}.

Известно, что один из механизмов устойчивости бактерий к ТМ – вывод металлов через отводящие помпы из клеток. Эти механизмы устойчивости очень похожи на механизмы устойчивости к антибиотикам на структурном и функциональном уровне, позволяют бактериям выживать в средах, загрязненных антибиотиками и тяжелыми металлами, и входят в число механизмов, способствующих приобретению стабильной совместной резистентности [3].

Таблица 2

Устойчивость к антибиотикам выделенных металлорезистентных штаммов бактерий

Штаммы	Антибиотики, мкг/мл																	
	Ap 100	Pn 100	Cb 100	Am 40	Kn 40	Gm 40	Nm 40	Nb 40	St 100	Tc 30	Ctc 30	Cf 40	Cfz 40	Mp 40	Tm 40	Chm 50	Rf 30	
<i>Serratia fonticola</i> SS0-1 ^{Cu,Pb}	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	
<i>Rhodococcus qingshengii</i> SS60-2 ^{Co, Ni, Pb, Cu}	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	
<i>Rhodococcus qingshengii</i> SS6-3 ^{Ni, Cu, Pb}	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	
<i>Pseudomonas fragi</i> SS0-4 ^{Zn, Cd, Cu, Pb}	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SS0-5 ^{Zn, Cu}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+	
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> SS0-6 ^{Zn, Cu, Pb}	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	+	+	–	

Штаммы	Антибиотики, мкг/мл																	
	Ap 100	Pn 100	Cb 100	Am 40	Kn 40	Gm 40	Nm 40	Nb 40	St 100	Tc 30	Ctc 30	Cf 40	Cfz 40	Mp 40	Tm 40	Chm 50	Rf 30	
<i>Pseudomonas cedrina</i> SS60-7 ^{Zn, Cu}	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	
<i>Serratia liquefaciens</i> SS60-8 ^{Zn, Cu}	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
<i>Serratia fonticola</i> SS0-9 ^{Pb, Ni}	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SS0-10 ^{Pb, Zn}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Serratia fonticola</i> SS12-11 ^{b, Cu}	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
<i>Citrobacter freundii</i> SS60-12 ^{Zn, Pb}	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	

Примечание. Ap, ампициллин; Pn, пенициллин; Cb, карбенициллин; Am, амикацин; Kn, канамицин; Gm, гентамицин; Nm, неомицин; Nb, новобиоцин; St, мтрентомицин; Tc, тетрациклин; Ctc, хлортетрациклин; Cf, цефатоксим; Cfz, цефтозидим; Mp, меропенем; Tm, триметоприм; Chm, хлорамфеникол; Rf, рифампицин.

Гены устойчивости к антибиотикам у бактерий могут располагаться в хромосомах и/или в мобильных генетических элементах, таких как транспозоны, интегроны и плазмиды. Когда несколько генов, придающих устойчивость, расположены близко друг к другу например, в плазмиде, это явление называется корезистентностью. Показано, что металлорезистентные гены и гены устойчивости к антибиотикам часто располагаются на одних и тех же мобильных генетических элементах, таких как плазмиды, транспозоны и интегроны. Это явление может привести к одновременной активации обеих категорий генов, когда бактерии подвергаются воздействию одного из стрессоров (антибиотиков или тяжелых металлов) в окружающей среде [4].

Работа поддержана грантом РНФ № 22-24-20074 от 21.03.2022 г.

Литература

1. Sørensen S.J., Bailey M., Hansen L.H., Kroer N., Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 (2005), pp. 700–710.
2. Seiler C., Berendonk T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.*, 3 (2012), p. 39.
3. Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.*, 14 (2006), pp. 176–182.
4. Di Cesare A., Eckert E.M., D'Urso S., Bertoni R., Gillan D.C., Wattiez R., Corno G. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res.*, 94 (2016), pp. 208–214.

Использование соединений железа метаноархеями из Арктических экосистем

Трубицын В.Э., Речкина В.И., Захарюк А.Г., Щербакова В.А.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
lichoradkin43@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38720

Ключевые слова: метаноархеи, железоредукция, биоинформационный анализ, многолетнемерзлые отложения.

Факторы, контролирующие скорость и масштабы образования метана в анаэробных экосистемах, представляют огромный интерес, поскольку метан является важным парниковым газом и представляет собой большой запас утилизируемой энергии, в настоящее время выведенной из оборота [1]. Доступность Fe (III) в качестве альтернативного акцептора электронов для микробного анаэробного дыхания может быть основным фактором, контролирующим количество образующегося метана. Многочисленные исследования показали, что, когда слабо кристаллические оксиды Fe (III) присутствуют в отложениях, то производство метана ингибируется [2]. Это обычно связано со снижением концентрации ацетата и водорода – двух основных доноров электронов для образования метана. Однако есть и информация, что метаногены могут принимать непосредственное участие в восстановление Fe (III) и гуминовых кислот в анаэробных экосистемах [3]. Но, несмотря на большое количество работ в этой области, остается ряд неизученных аспектов. В низкотемпературных экосистемах исследования в данном направлении находятся на начальном этапе, несмотря на то, что метанобразующие микроорганизмы присутствуют в вечной мерзлоте повсеместно, составляя около 1–1.5% часть сообщества, а в отдельных случаях их численность достигает 10–50%. [4,5]. В связи с этим, целью нашей работы было проанализировать способность арктических штаммов метаногенных архей участвовать в цикле железа в экстремально холодных экосистемах, используя лабораторные эксперименты и методы биоинформационического анализа.

Для сравнительного геномного исследования были проанализированы последовательности геномов штаммов *Methanobacterium spitsbergense* VT^T, *M. arcticum* M2^T и *M. veterum* MK4^T, ранее выделенных нами из ММО. Кроме того, из базы данных NCBI были взяты геномы арктического штамма *Methanobacterium* sp. SMA-27 и двух неарктических штаммов, *M. lacus* AL-21 и *M. bryantii* M.o.H.^T. Отобранные для исследования организмы кластеризовались в виде двух филогенетических групп: «SMA-27/VT^T/AL-21» и «M2/MK4^T/M.o.H.^T», в пределах каждой из них проводили сравнение между штаммами, выделенными из вечной мерзлоты и ближайшими неарктическими представителями. В результате пангеномного анализа у арктических водородиспользующих метаноархей обнаружено всего 8 белок-кодирующих последовательностей, не встречающихся у ближайших неарктических штаммов. Среди общих генов у арктических штаммов присутствовали ортологичные гены флавин-редуктаз и изохаризматаз, заимствованные у микроорганизмов других таксономических групп, а именно *Bacillota* и *Pseudomonadota*. Таким образом, кодируемые этими генами белки оказываются достаточно значимыми для выживания в условиях вечной мерзлоты, поэтому были заимствованы из геномов бактерий независимо друг от друга в двух группах штаммов.

Согласно базам данных eggNOG и PFAMs у арктических метаноархей увеличилось количество флавин-редуктаз, липокалинов (связанных, в том числе, с транспортом железа) и мембранных транспортёров двухвалентных металлов и уменьшилось количество белков с железо-серными кластерами, ферредоксинов и рубредоксинов. Такие изменения в наборе генов метаноархей рода *Methanobacterium* свидетельствуют о действительной адаптации в отношении ассимиляции железа.

Для экспериментальной оценки результатов биоинформационического анализа проведены исследования способности восстанавливать соединения трехвалентного железа чистыми культурами арктических и

неарктических метаногенных архей родов *Methanosarcina* (содержат цитохромы) и *Methanobacterium* (не содержат цитохромы). Результаты полученных экспериментов позволяют предположить существование сложной взаимосвязи биогеохимических циклов железа и метана в арктических многолетнемерзлых отложениях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00518.

Литература

1. Schuur E.A.G., McGuire A.D., Schädell C., Grosse G., W. Harden J., Hayes D.J., Hugelius G., Koven C.D., Kuhry P., Lawrence D.M., Natali S.M., Olefeldt D., Romanovsky V.E., Schaefer K., Turetsky M.R., Treat C.C., Vonk J.E. Climate change and the permafrost carbon feedback // Nature. 2015. Т. 520. № 7546. С. 171–179.
2. Chidthaisong A., Conrad R. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil // FEMS Microbiology Ecology. 2000. Т. 31. № 1. С. 73–86.
3. Bond D.R., Lovley D.R. Reduction of Fe (III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones // Environmental Microbiology. 2002. Т. 4. № 2. С. 115–124.
4. Shcherbakova V., Yoshimura Y., Ryzhmanova Y., Taguchi Y., Segawa T., Oshurkova V., Rivkina E. Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost // FEMS Microbiology Ecology. 2016. Т. 92. № 10. С. fiw135.
5. Vishnivetskaya T.A., Buongiorno J., Bird J., Krivushin K., Spirina E., Oshurkova V., Shcherbakova V., Wilson G., Lloyd K., Rivkina E. Methanogens in the Antarctic dry valley permafrost // FEMS microbiology ecology. 2018. Т. 94. № 8. С. fiy109.

СЕКЦИЯ 3

РЕСУРСНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Алексей Михайлович Безбородов (1924–2024)
(к 100-летнему юбилею ученого)

Кувичкина Т.Н.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино Московской обл.

kuv@ibpm.pushchino.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38721

А.М. Безбородов советский и российский микробиолог, биохимик, доктор биологических наук (1965), профессор (1966), заслуженный деятель науки РСФР (1984), лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники (1998).

1 февраля 2024 года исполняется 100 лет со дня рождения выдающегося российского ученого Алексея Михайловича Безбородова. Он участник Великой Отечественной войны (1942–1945). Награжден двумя орденами (орден «Красной звезды» и «Великой Отечественной войны второй степени»).

Алексей Михайлович был в первой группе выпускников инженерно-микробиологического факультета Ленинградского химико-фармацевтического института в 1952 г., в 1955 г. закончил аспирантуру. В 1955–1960 гг. – заведующий лабораторией технологии антибиотиков в Ленинградском НИИ антибиотиков. С 1960 по 1967 г. Алексей Михайлович возглавлял кафедру технологии продуктов микробного синтеза (технологии антибиотиков), а так же исполнял функции проректора ЛХФИ.

В 1967 г. по решению Отдела науки ЦК КПСС и Ленинградского ГК КПСС Алексей Михайлович был переведен на работу в Москву в АН СССР в Институт биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ). В нем Алексей Михайлович возглавлял лабораторию биосинтеза биологически активных соединений в 1967–1976 гг. Кроме того, по совместительству в 1975–1992 гг. – профессор кафедры биотехнологии Московского технологического института пищевой промышленности. В 1976–2002 гг. Алексей Михайлович – заведующий лабораторией ферментов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР (РАН). С 1981–2014 гг. – заместитель Главного редактора журнала «Прикладная биохимия и микробиология» (Applied Biochemistry and Microbiology).

Основные направление научной деятельности

Микробиологический синтез биологически активных соединений, их выделение, очистка и идентификация. Регуляция процессов биосинтеза. Биосинтез полупродуктов используемых в органическом

синтезе. Получение ферментов микроорганизмов, их изучение и применение в процессах биотехнологии. Ферментативная (микробиологическая) деструкция ксенобиотиков. Разработка теоретических основ процесса микробиологического синтеза.

В области ферментов микроорганизмов существенные успехи были достигнуты в результате изучения рибонуклеаз микромицетов. Выделены рибонуклеазы с различной субстратной специфичностью, изучены их первичная и третичная структуры. Две из них были использованы для синтеза олигорибонуклеотидов, как пример обратного действия гидролаз. Показана трансгликозилирующая активность бета-галактозидазы на примере ферментов, выделенных из культур дрожжей и грибов. При изучении каталитической активности альфа-галактозидаз было получено принципиальное решение о возможности изменения специфичности группы крови человека и животных. Большой вклад внесен А.М. Безбородовым в изучение и получение различных продуктов микробиологического синтеза, являющихся физиологически активными соединениями, регуляторами метаболизма, полупродуктами органического синтеза. Выделены, идентифицированы и изучены оригинальные ингибиторы протеолитических ферментов, липазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, имеющие белковую природу, выполняющие регуляторные функции в клетках микроорганизмов. Осуществлен биосинтез новых низкомолекулярных ингибиторов протеаз, являющихся ацилированными олигопептидами, определена их структура и физико-химические свойства. В области биосинтеза полупродуктов промышленного органического синтеза, получение которых сопряжено с большими затратами на дополнительную очистку, были разработаны ферментативный способ получения эпоксидов из н-алканов с различным числом углеродных атомов в структуре, а также синтез *cis-cis*-муконовой кислоты – мономера, предшественника синтеза полимеров. Для реализации процесса были выделены и изучены ферменты, осуществляющие реакции: катехол – 1,2 – диоксигеназа и пропанмонооксигеназа. В ходе изучения механизмов биосинтеза низкомолекулярных микробных метаболитов разработана принципиально новая схема ферментативного синтеза нуклеозидтрифосфатов, по которой одновременно получают рибозо – 5 – фосфат и фосфорибозилпирофосфат. Расшифрован механизм биогенеза одного из мембранных ионофоров – энниатина. А.М. Безбородов одним из первых ученых в СССР обратил внимание на микроорганизмы, как продуценты алкалоидов. А.М. Безбородов был в числе авторского коллектива, участвующего в создании полиенового антибиотика леворина, одной из отечественных разработок, получивших реализацию в промышленности.

Сконструирована система из нескольких ферментов для деградации смесей летучих углеводородов. Результатом теоретических разработок стала их практическая реализация в виде промышленных установок по очистке воздуха на основе иммобилизованных клеток микрорганизмов, выполненная совместно с коллективом ученых Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Премия имени А.Н. Баха (1993) получена за цикл исследований «Ферментативные реакции в биотехнологии». Алексей Михайлович Безбородов являлся членом бюро научного совета АН СССР, РАН по микробиологии (зам. председателя, руководитель секции), 1968 г. и все последующие, членом бюро научного совета АН СССР по биотехнологии, 1981 год, вице-президентом Всесоюзного Микробиологического общества, 1968–1972 гг. председателем Советско-Чехословацкой комиссии АН СССР по сотрудничеству в области микробиологии, 1968–1990 гг. членом экспертной комиссии по Премиям Правительства РФ в области биотехнологии, 1998 год, экспертом Госплана СССР по микробиологической промышленности, 1976–1990 гг. членом экспертной комиссии ВАК СССР, 1983–1995 гг. зам. главного редактора журнала «Микробиологический синтез» («Микробиологическая промышленность»), 1967–1983 гг. действительным членом Академии наук, образования, промышленности и искусств (Калифорния, США), 1998.

Научные труды А.М. Безбородова – это фундаментальный вклад в развитие микробиологии и биотехнологии. Он – автор около трехсот научных публикаций в отечественных и зарубежных журналах, трех учебников и девяти монографий. Среди них можно отметить «Метаболиты внутриклеточного фонда микроорганизмов» (1974), «Биохимические основы микробиологического синтеза» (1984), «Введение в биотехнологию» (2002), «Ферментативные процессы в биотехнологии» (2008), «Микробиологический синтез» (2011). Пятьдесят два человека защитили под руководством А.М. Безбородова кандидатские диссертации.

Потенциал арктических грибов *Pseudogymnoascus* в биосинтезе вторичных метаболитов

Антипова Т.В.¹, Зайцев К.В.², Желифонова В.П.¹, Тарлачков С.В.¹,
Баскунов Б.П.¹, Гришин Ю.К.², Кочкина Г.А.¹, Вайнштейн М.Б.¹

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
«ФИЦ ПНЦ БИ РАН»
tatantip@rambler.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38722

Ключевые слова: макролиды, макросфелиды А и В, Арктика, кластеры генов.

Грибы *Pseudogymnoascus spp.* Railo 1929 анаморфа *Geomyces* широко присутствуют в природе и встречаются практически повсеместно от Арктики до Антарктики [1, 2]. Они могут существовать в морской среде и распространяться глубоководными течениями. Очень часто их изолируют в низкотемпературных экотопах [3, 4]. Эти грибы не являются настоящими психрофилами или галофилами, но способны развиваться в холодных условиях при пониженном уровне питания и повышенном содержании солей. *Pseudogymnoascus spp.* обладают способностью вырабатывать адаптированные к холodu ферменты для выживания в низкотемпературных местообитаниях. Грибы рода *Pseudogymnoascus* могут быть антагонистами возбудителей парши картофеля в почвах картофельных полей. Они отмечены как одни из преобладающих микробных колонизаторов корневой эндосферы и ризосферы газонных систем. При этом исследования вторичных метаболитов этих грибов изучены недостаточно. Экстракти некоторых штаммов *Pseudogymnoascus* проявляют мощную биологическую активность, такую как противомикробную, гербицидную и противоопухолевую. Известно несколько исследований вторичных метаболитов грибов рода *Pseudogymnoascus*, и большинство полученных структур представляют собой поликетиды; эти соединения проявляют противомикробную активность. Из штамма *Pseudogymnoascus* sp. PF-1464 был выделен новый красный пигмент амфиол, обладающий антифунгальной активностью. У антарктических грибов *Pseudogymnoascus* были обнаружены шесть новых тримулановых сесквитерпеноидов, обладающих противоопухолевой активностью. Редкие исследования вторичных метаболитов грибов этого рода показывают, что существует скрытый биосинтетический потенциал для поиска новых соединений. В настоящей работе были исследованы вторичные метаболиты штаммов *Pseudogymnoascus* sp. BKM F-4518 и BKM F-4519 и проанализированы предполагаемые кластеры генов их биосинтеза.

Штаммы были выделены из поверхностного слоя грунта на Колымской низменности. Их выращивали глубинно в минеральной среде в течение 11 дней при температуре 24 °C. Вторичные метаболиты выделяли из культуральной жидкости экстракцией хлороформом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле. С помощью масс-спектрометрии, одно- и двумерной спектроскопии ЯМР была установлена структура вторичных метаболитов. Так, штаммы являются продуцентами двух соединений, которые были идентифицированы как макролидные антибиотики макросфелиды А и В (рис.). Макросфелиды А и В представляют собой метаболиты поликетидной природы, относящиеся к 16-членным трилактоновым макролидам. Ключевой структурный мотив макролидов включает трехлактонный остов.

Макросфелиды А и В впервые обнаружены у гриба *Microsphaeropsis* sp. Позднее было описано еще 13 макросфелидов в различных таксонах грибного царства. Для грибов *Pseudogymnoascus* эти метаболиты обнаружены впервые. Изученные штаммы являются высокоактивными продуцентами макросфелидов А и В по сравнению с известными в литературе. Для макросфелидов А и В известна антимикробная и противоопухолевая активность. Макросфелид А ингибирует рост протестированных аскомицетов, базидиомицетов, оомицетов и грамположительных бактерий, включая *Staphylococcus aureus*. Исследована способность гибридных соединений, состоящих из макросфелидов и тиазолсодержащей боковой цепи,

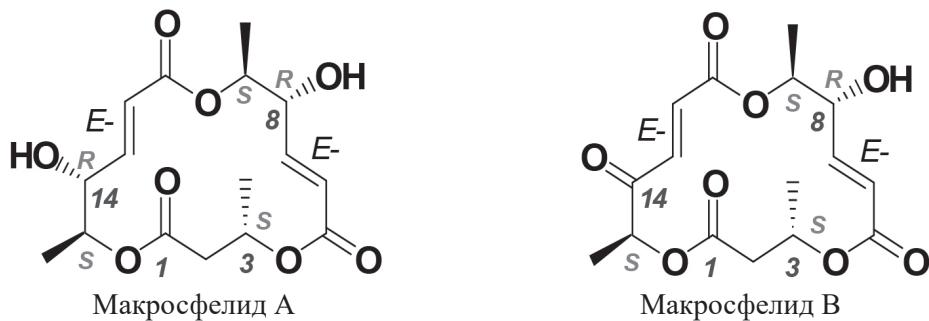


Рис. Структуры вторичных метаболитов *Pseudogymnoascus* sp.

индуцировать апоптоз. Было показано, что макросфелид А не обладает острой токсичностью. Таким образом, макросфелид А может стать многообещающим средством для лечения рака.

Биосинтетический кластер генов биосинтеза (**BGC**) макросфелидов еще не описан. На основе сравнения кластера генов макротриолидов гриба *Paraphaeosphaeria sporulosa* с помощью программы BLAST+ мы обнаружили полные предполагаемые **BGC** макросфелидов в геномах двух штаммов *Pseudogymnoascus*. С помощью программы antiSMASH мы обнаружили, что геном штамма BKM F-4518 содержит 32 биосинтетических кластера генов вторичных метаболитов (**BGC**), а геном BKM F-4519 содержит 17 **BGC**. Таким образом, при культивировании этих штаммов в наших условиях экспрессировался только **BGC** макросфелидов. Мы предполагаем, что экспрессия других **BGC** этих штаммов может привести к биосинтезу новых природных соединений.

Литература

1. Ozerskaya S., Kochkina G., Ivanushkina N., Gilichinsky D. Fungi in permafrost. In: Permafrost Soils. Soil Biology; Margesin, R., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, Germany, 2009; Volume 16, pp. 85–95. doi: 10.1007/978-3-540-69371-0_7.
 2. Kochkina G., Ivanushkina N., Ozerskaya S., Chigineva N., Vasilenko O., Firsov S., Spirina E., Gilichinsky D. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2012, 82, 501–509. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01442.x.
 3. Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Akimov V.N., Gilichinskii D.A., Ozerskaya S.M. Halo- and psychrotolerant Geomyces fungi from arctic cryopegs and marine deposits. *Microbiology (Moscow)*, 2007, 76, 31–38. doi: 10.1134/S0026261707010055.
 4. Leushkin E.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Sutormin R.A., Gerasimov E.S., Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Vasilenko O.V., Kondrashov A.S., Ozerskaya S.M. Comparative genome analysis of *Pseudogymnoascus* spp. reveals primarily clonal evolution with small genome fragments exchanged between lineages. *BMC Genomics*, 2015, 16, 400. doi: 10.1186/s12864-015-1570-9.
 5. Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zhelifonova V.P., Tarlachkov S.V., Grishin Y.K., Kochkina G.A., Vainshtein M.B. The Potential of arctic *Pseudogymnoascus* fungi in the biosynthesis of Natural Products. *Fermentation* 2023, 9, 702. doi: 10.3390/fermentation9080702.

Очистка лизиноксидазы от бактериальных эндотоксинов

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38723

Ключевые слова: лизин-оксидаза, эндотоксин, очистка.

Лизин-оксидаза (ЛО) из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D проявляла дозозависимый цитотоксический эффект в отношении различных линий раковых клеток. Раковые клетки более чувствительны к дефициту незаменимых факторов роста, включая аминокислоты. Снижение уровня L-лизина является основным механизмом, способствующим противоопухолевому эффекту LO. Эндотоксины, также называемые липополисахаридами (ЛПС), являются основными загрязнителями препаратов потенциальная иммуногенность которых, является ограничивающим фактором для клинического применения. Иммунный ответ с образованием антител возникает через несколько дней после однократной инъекции белков.

Инъекционные лекарственные формы должны быть максимально избавлены от примесей эндотоксинов. Фармакопеи всего мира рекомендуют лимитировать содержание эндотоксина до 5 единиц (1Е равна 100 пкг эндотоксина). Эндотоксины (ЭТ) или липополисасиды (ЛПС) – представляют собой фрагменты клеточной стенки бактерий размером от 10 до 20 кДа. ЛПС являются высокотоксичными для человека

Способы очистки

1) В водных растворах эндотоксины в присутствии солей Ca^{2+} или Mg^{2+} образуют устойчивые высокомолекулярные структуры свыше 1000 кДа.

Ультрафильтрация (мембранные с порами до 300 кДа). Наш белок (115 кДа) уходит с раствором а эндотоксины остается в ячейке.

2) Ионообменная хроматография. Обессоленный раствор нашего белка наносится на колонку с ДЕАЕ-сефарозой. Низкие концентрации NaCl – 0,1 М приводят к десорбции лизиноксидазы, тогда как эндотоксины, элюируются только при концентрации NaCl – 0,5 М.

3) Гидрофобная хроматография. Лизиноксидаза наносится на колонку с октил-сефарозой в растворе сульфата аммония 20–25% насыщения. Эндотоксины удерживаются сорбентом сильнее, чем лизиноксидаза, которая десорбируется при снижении концентрации сульфата аммония 10% насыщения.

4) Аффинная хроматография. Использование полимиксин или гистидин В-сефарозы, содержащей поверхностно-активный положительно заряженный циклический пептид. При нанесении белка, эндотоксин дезагрегирует от белка иочно связывается с лигандом через липидную компоненту. Очищенный белок элюируется растворами с низкой ионной силой.

Мы объединили аффинную хроматографию со стадией промывки неионным моющим средством (Triton X-114), чтобы удалить большую часть эндотоксиновых загрязнений из конечного продукта. Было достигнуто снижение содержания эндотоксина менее чем с 5–6 до 0,2 EU мг при извлечении лизиноксидазы с выходом, близким к 100%.

Выходы

Эффективное и рентабельное удаление эндотоксинов из фармацевтических и биотехнологических препаратов является сложной задачей. Несмотря на разработку новых методов, таких как двухфазные водные мицеллярные системы, в последние годы необходимы дополнительные исследования в этой области.

Литература

1. Lukasheva E.V., Babayeva G., Karshieva S.S., Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S. L-Lysine α -Oxidase: Enzyme with Anticancer Properties. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 22; 14(11):1070. doi: 10.3390/ph14111070.
2. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C., Pessoa A.Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2007; 10(3):388-404.
3. Lukasheva E.V., Efremova A.A., Treshalina E.M., Arinbasarova A.Y., Medentzev A.G., Berezov T.T. L-Amino acid oxidases: Properties and molecular mechanisms of action. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2011, 5, 337–345.

Особенности реакции *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* на разные концентрации нефти и тяжелых металлов в среде

Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Исупова Н.А., Самигуллина Г.З.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
buharin@udmlink.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38724

Ключевые слова: микромицеты, тяжелые металлы, металлпрезистентность, устойчивость к нефтяному загрязнению.

Ухудшение качества почвы, вызванное загрязнением тяжелыми металлами и нефтепродуктами, является растущей глобальной проблемой, возникающей в результате хозяйственной деятельности человека, что, в свою очередь, ведет и к гибели растений. Однако растения, находящиеся в ассоциации с корневыми микромицетами, имеют более широкие пределы устойчивости к внешним факторам. Эндофитные корневые микромицеты представляют наибольший интерес точки зрения влияния на устойчивость растений: они морфологически разнообразны по своему строению, имеют широкий ареал распространения и жизнеспособны в стрессовых условиях. Цель исследования – установить пределы устойчивости представителей эндофитных грибов к содержанию нефти и тяжелых металлов в субстрате. В качестве объектов исследований были использованы эндофитные грибы *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*. Грибы выделены из корневой системы растений, произрастающих на техногенных территориях города Ижевска (Удмуртская Республика). Видовая принадлежность грибов установлена методами молекулярного анализа ДНК в лаборатории Лейбницкого института овощных и декоративных культур (г. Берлин) [1].

Культуры грибов выращивали на питательной агаровой среде (PDA) из декстрозного бульона и агар-агара с добавлением разных концентраций тяжелых металлов и нефти. Тяжелые металлы вносили в следующих концентрациях: Zn – 100, 200, 300 мг/л; Cu – 50, 100, 150 мг/л; Cr – 2.5, 5, 10 мг/л; Pb – 25, 50, 100 мг/л, нефть – в концентрациях 1, 2.5, 5, 7.5 и 10%. Особенности реакции грибов на условия стресса оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) [2]. Математическая обработка результатов проведена с использованием пакета «Statistica 6.0» методами описательной статистики.

Исследование роста культур *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* на средах с тяжелыми металлами показало высокие пределы устойчивости грибов к загрязнителю. Содержание меди и цинка в среде оказало влияние на рост *Cylindrocarpon magnusianum*: размеры колоний гриба при всех концентрациях металлов достоверно были меньше, по сравнению с контролем. При этом размеры колоний уменьшались в соответствие с увеличением концентрации металлов. Тем не менее, пороговые концентрации меди и цинка для *Cylindrocarpon magnusianum* пока обнаружены не были. Скорость роста гриба, так же, как и размеры его колоний, при всех концентрациях меди и цинка достоверно уменьшилась по сравнению с контролем, особенно в первую неделю эксперимента. Хром и свинец оказались

менее токсичными для *C. magnusianum*. Содержание в среде хрома во всех исследуемых концентрациях не оказалось влияния на рост гриба: размеры его колоний не имели достоверных отличий от контроля. Варианты со свинцом в концентрациях 50 и 100 мг/л также достоверно не отличались от контрольного варианта. Однако содержание в среде свинца в концентрации 25 мг/л стимулировало рост колоний гриба. Достоверной разницы в скорости роста колоний гриба между остальными опытными вариантами и контролем, как и в эксперименте с хромом, не наблюдалось до окончания эксперимента.

Наибольшее ингибиование роста культуры *F. equiseti* вызвало содержание в среде цинка и меди. С увеличением концентрации этих элементов диаметр колоний гриба уменьшался. Наиболее токсичной оказалась концентрация меди 150 мг/л, однако даже при такой концентрации металла рост гриба не прекратился.

Содержание в среде хрома и свинца, как и в эксперименте с *C. magnusianum*, существенного влияния на рост *F. equiseti* не оказалось. Тем не менее, диаметр колоний гриба при всех исследуемых концентрациях хрома в среде был достоверно меньше по сравнению с контролем, при этом сами варианты Cr 2.5, Cr 5 и Cr 10 мг/л достоверной разницы между собой не имели. Скорость роста *F. equiseti* при внесении в среду хрома и свинца в разных концентрациях была достоверно ниже контрольного варианта, однако разница была незначительной.

Таким образом, культуры микромицетов *F. equiseti* и *C. magnusianum* показали высокую устойчивость к содержанию тяжелых металлов в среде, особенно хрома и свинца. К содержанию цинка и меди в среде *C. magnusianum* проявил большую устойчивость по сравнению с *F. equiseti*.

Анализ содержания МДА в мицелии *F. equiseti* и *C. magnusianum* показал зависимость увеличения этого показателя от концентрации химических элементов в среде. Наибольшая реакция на содержание хрома в среде наблюдалась у *C. magnusianum*: содержание МДА во всех вариантах было существенно выше, чем в контроле. Однако при самой высокой концентрации хрома 10 мг/л содержание МДА в мицелии гриба было достоверно ниже, чем в других вариантах с хромом. На *F. equiseti* большее влияние оказало содержание меди в среде: с увеличением концентрации меди содержание МДА в мицелии достоверно увеличивалось по отношению к контролю. В мицелии *C. magnusianum* при внесении в среду меди содержание МДА также было достоверно выше по сравнению с контролем (кроме Cu 50 мг/л), однако отличие было не столь значительным, как в эксперименте с *F. equiseti*. Таким образом, можно заключить, что синтез МДА играет роль в системе адаптивных реакций грибов.

При всех исследуемых концентрациях нефти наблюдался рост *F. equiseti* и *C. magnusianum*. В эксперименте с *F. equiseti* наибольшее ингибиование роста вызвала концентрация нефти 10%, однако пороговой она не оказалась. При содержании в среде нефти в концентрациях 1, 2.5 и 5% скорость роста колоний гриба в течение первой недели была выше, чем в контрольном варианте. К концу эксперимента скорость роста колоний снизилась и была ниже, чем в контроле во всех опытных вариантах с нефтью. *C. magnusianum*, наоборот, в начале эксперимента не отличался активным ростом (период адаптации), а со второй недели эксперимента проявлял высокие показатели роста колоний.

По результатам можно сделать следующие выводы. Культуры *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* обладают в целом высокой металлорезистентностью, при этом большую устойчивость они проявили к хруму и свинцу, чем к биогенным элементам (цинку и меди). Концентрация меди 150 мг/л для *F. equiseti* оказалась наиболее токсичной, но не пороговой. Исследование динамики образования малонового диальдегида в мицелии *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* под действием тяжелых металлов показало, что грибы обладают видоспецифичностью по отношению к тяжелым металлам: *C. magnusianum* более устойчив к действию высоких концентраций меди, *F. equiseti* – хрома. Исследуемые культуры грибов проявили устойчивость к содержанию нефти в среде, но при этом отмечены видоспецифические стратегии адаптации видов к фактору нефтяного загрязнения.

Литература

1. *Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K. and Islamova N.* About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR). – Vol. 7, Issue 4. – 2016. – P. 1386–1394.
2. Жильцова Ю.В. Зависимость антиоксидантно-прооксидантного равновесия в макрофитах от уровня антропогенной нагрузки / Ю.В. Жильцова // Труды БГУ 2011. – Т. 6, часть 2. – С. 47–54.

На что еще способен *Gluconobacter oxydans*?

Быков А.Г.¹, Тарасов С.Е.¹, Плеханова Ю.В.¹, Баскаков С.А.², Решетилов А.Н.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино

agbykov@rambler.ru

² Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38725

Ключевые слова: *Gluconobacter oxydans*, графен, микробное восстановление, оксид графена, биосенсор.

Одним из направлений улучшения аналитических характеристик электрохимических биосенсоров является использование в их составе наноматериалов. Особое внимание исследователей приковано к графеновым материалам. Графен – это двумерная структура, в которой атомы углерода выстроены в вершины правильных шестиугольников. Он обладает отличной электропроводностью и высокой площадью поверхности. В настоящее время наиболее распространенным подходом к промышленному получению графена является химическое восстановление оксида графена, который в свою очередь может быть получен из графита. Существующие методы синтеза обладают рядом недостатков: в химических методах используются сильные восстановители, токсичные для окружающей среды; для термического восстановления в газообразном водороде необходима высокая температура и специальные реакторы, а электрохимическое восстановление является энергоемким и требует дорогостоящих платиновых электродов [1]. Одна из неожиданных возможностей получения оксида графена с помощью легко масштабируемого и экономически эффективного способа связана со способностью некоторых бактерий к восстановлению химических соединений. Такой подход можно отнести к концепции «зеленой химии», позволяющей снизить антропогенное загрязнение окружающей среды. В данной работе исследовали способность уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans* к восстановлению оксида графена с последующим использованием полученного материала в составе биосенсоров.

В данной работе исследовали 3 штамма *Gluconobacter oxydans*: *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280, *Gluconobacter oxydans* ВНТК ВНИВИ 9.4, *Gluconobacter oxydans* ВНТК ВНИВИ 6. Оксид графена был получен в лаборатории спектроскопии наноматериалов Института проблем химической физики РАН, Черноголовка. Условия культивирования бактерий варьировали для нахождения оптимальных параметров восстановления оксида графена. Полученные графеновые материалы отделяли от бактерий с помощью центрифugирования при 12 000 об/мин в течение 10 минут, а затем промывали поочередно 80% этанолом и 1M раствором соляной кислоты. Оценку степени восстановления оксида графенов проводили визуально и с помощью метода ИК-спектроскопии. В дальнейшем полученные материалы использовали для модификации микробных электрохимических биосенсоров на основе печатных графитовых электродов. Все электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата-гальваностата EmStat 3 (Palmsens, Нидерланды).

Три штамма уксуснокислых бактерий культивировали в присутствии оксида графена и наблюдали за изменением окраски растворов в течение 9 суток. Во время культивирования микроорганизмов фиксировали изменение цвета от коричневато-желтого до черного, что является первичным критерием протекания процесса восстановления оксида графена. Было показано, что наиболее эффективно восстанавливает графен штамм *G. oxydans* ВКМ В-1280, наблюдали изменение окраски также у штамма ВНТК ВНИВИ 9.4. При культивировании штамма ВНТК ВНИВИ 6 окраска раствора практически не изменяется.

Возможность восстановления оксида графена может быть связана с наличием у микроорганизмов гем-содержащих белков, относящихся к классу цитохромов и содержащих в своей структуре гем типа с. Основная функция цитохрома с – перенос электрона, но также он способен катализировать гидрок-

силирование и окисление ароматических углеводородов. Можно предположить, что он также участвует в процессе восстановления оксида графена и от его концентрации и активности зависит возможность применения микроорганизма для синтеза графена [2].

Варьировали различные параметры культивирования микроорганизмов для нахождения оптимальных условий реакций. Варьировали pH реакционной смеси, наличие/отсутствие источника энергии (сорбита), влияние ультразвука на осаждение графена, а также длительность культивирования. Были выбраны оптимальные параметры культивирования, при которых скорость и степень восстановления графена были максимальны.

Для оценки степени восстановления графена был использован метод ИК-спектроскопии, которым оценивали образцы оксида графена до культивирования с клетками и после культивирования. Виды спектров представлены на рис. 1. Из полученных спектров видно, что в образце после восстановления уменьшается широкая полоса около 3600 cm^{-1} , которая соответствует $-\text{OH}$ деформационным колебаниям. Кроме того, сильно сокращается полоса около 1730 cm^{-1} , отражающая колебания связи $\text{C}=\text{O}$ в карбоксильных группах, а также присутствует сильная полоса пропускания при 1417 cm^{-1} . Все это можно связать с уменьшением количества кислородсодержащих групп, что свидетельствует о наличии эффективного процесса восстановления оксида графена с получением графеноподобного соединения – восстановленного оксида графена, близкого по своим свойствам к чистому графену.

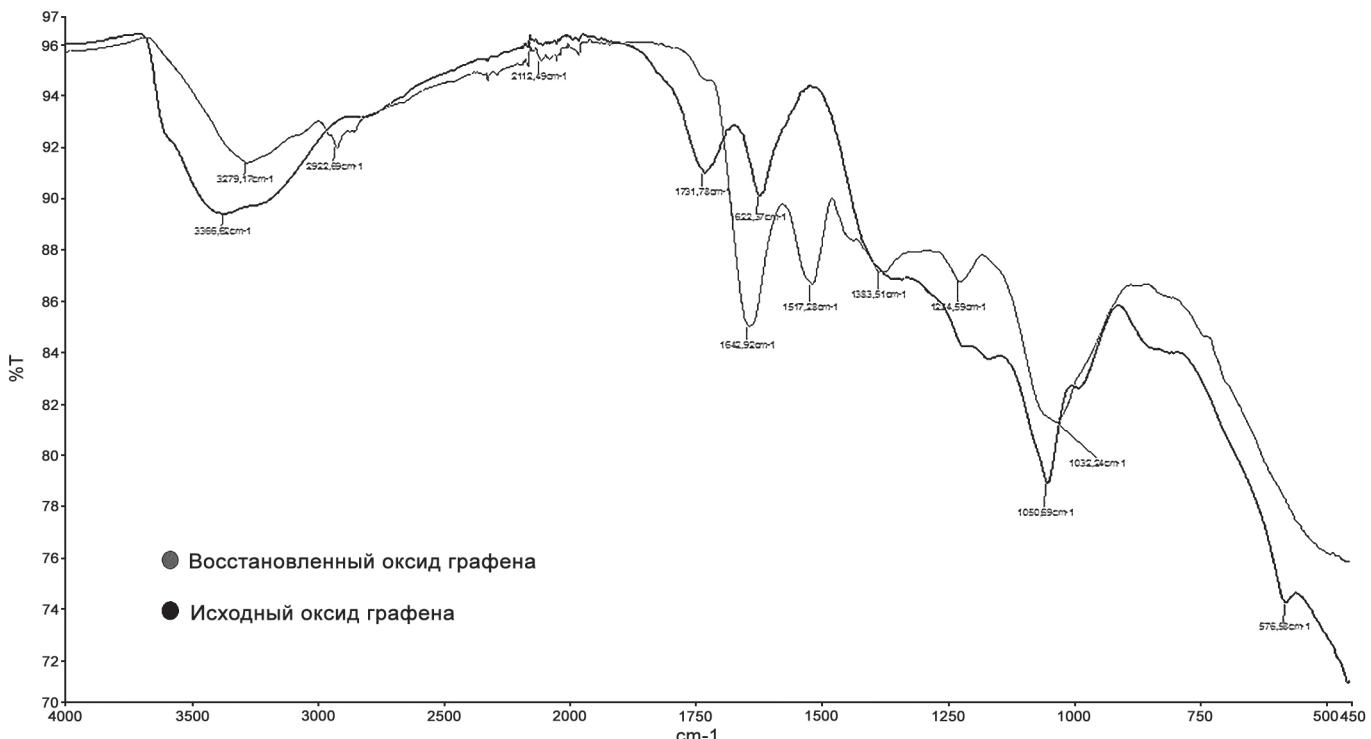


Рис. 1. ИК-спектры образцов оксида графена до и после микробного восстановления

Для оценки электрохимических свойств полученного материала его добавляли в состав полимерной матрицы на поверхности электрохимических микробных биосенсоров. Известно, что оксид графена не проводит электричество, поэтому в качестве контроля использовались образцы биосенсоров, модифицированные исходным оксидом графена и контрольные, не модифицированные наноматериалом. На рис. 2 представлены виды сигналов 3 вариантов биосенсоров: контрольного, модифицированного исходным оксидом графена, и модифицированных полученными в процессе восстановления разными штаммами материалами. В качестве биокатализатора во всех случаях использовали бактерии *G. oxydans* ВКМ В-1280 (0,36 мг/мм²), субстрат – глюкоза (2 mM). Сигнал биосенсора при модификации электрода оксидом графена уменьшился с 65 до 30 нА что свидетельствует о непроводящей природе этого материала. В то же время, при внесении синтезированного нами восстановленного оксида графена, сигнал биосенсора увеличивался в 6–8 раз.

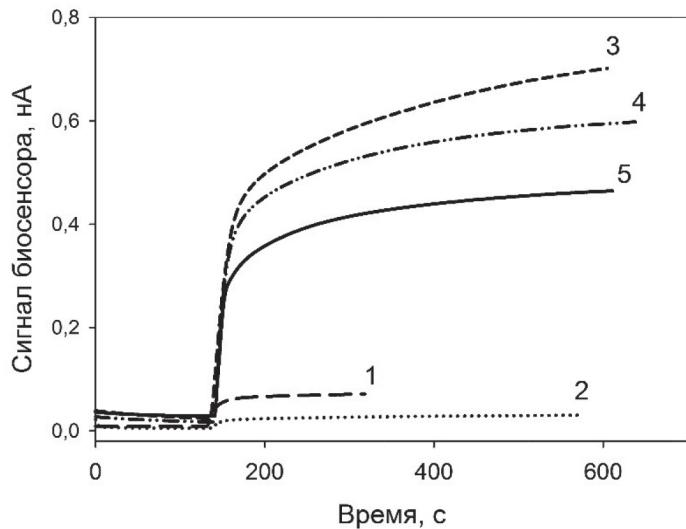


Рис. 2. Виды сигналов микробных амперометрических биосенсоров: 1 – контрольный немодифицированный электрод; 2 – модифицированный исходным оксидом графена; 3–5 – модифицированные восстановленным бактериями *G. oxydans* оксидом графена, штамм 1280, штамм 9.4 и штамм 6, соответственно

Таким образом, нами был предложен простой, эффективный и экологически чистый метод синтеза оксида графена с помощью уксусно-кислых бактерий, который может быть использован в дальнейшем для создания микробных биосенсоров и биотопливных элементов с высокой чувствительностью и эффективностью.

Литература

1. Wang G., Qian F., Saltikov C.W., Jiao Y., & Li Y. (2011). Microbial reduction of graphene oxide by *Shewanella*. *Nano Research*, 4(6), 563–570. doi:10.1007/s12274-011-0112-2
2. Salas E.C., Sun Z., Lütge A., & Tour J.M. (2010). Reduction of Graphene Oxide via Bacterial Respiration. *ACS Nano*, 4(8), 4852–4856. doi:10.1021/nn101081t

Потенциал полиненасыщенных жирных кислот для получения бактерицидных веществ

Доморатская Д.А.

ФГБУ «Всероссийский центр защиты растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева»
danadomoratskaya@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38726

Ключевые слова: полиненасыщенных жирные кислоты, тиофены, бактерии, биологически активные вещества, антибиотики.

Полиненасыщенные длинные жирные кислоты за счет своей химической структуры (большое количество углерода, непрочно связанного с водородом) могут относительно просто преобразовываться соответствующими ферментами в разнообразные соединения – образовывать кольца (полностью углеводородные или с включением атомов, например, серы), присоединять различные остатки (например, аминогруппы). Они привычны нам в составе метаболома эукариотических организмов, таких как растения, но некоторые прокариоты также способны вырабатывать их и их производные. Многие из них могут быть химическими предшественниками биологически активных веществ, уже известных или новых, которые

могут в теории обладать антибиотической или иной полезной для человека активностью. Поиски в этой области потенциально дают решение для проблемы глобальной антибиотикорезистентности.

Примерами таких веществ являются соединения ряда тиофенов, часто встречающихся в растениях семейства Астровые, у которых были выявлены бактерицидные, гельминтоцидные и прочие применимые в сельском хозяйстве свойства (Mishra et al., 2018). Метаболический путь таких соединений в растениях как раз включает в себя этапы формирования коротких жирных кислот с их последующими десатурацией и элонгацией и впоследствии включением серы в кольцевые участки молекул (Ibrahim et al. 2016).

Исследование метаболитов некоторых микроорганизмов выявило наличие полиненасыщенных жирных кислот. Их химическая структура позволяет глубоководным и донным прокариотам выживать в таких экстремальных условиях. Среди таких микроорганизмов описаны бактерии родов *Photobacterium*, *Shewanella*, *Moritella*, *Colwellia*, *Psychromonas*, *Alteromonas*, и *Vibrio* (Shah et al., 2022). Гены, отвечающие за производство полиненасыщенных жирных кислот, были описаны и объединены в кластеры, причем они не являются строго консервативными и могут иметь различные гомологи. Описанные метаболические пути синтеза полиненасыщенных жирных кислот могут быть использованы для создания продуцентов, более производительных и адаптированных для промышленного культивирования, чем эукариотические организмы. Получение бактерицидных производных на их основе может осуществляться как одновременно с микробиологическим синтезом, так и путем последующих модификаций, например, с использованием соединений серы для производства тиофенов. Таким образом, бактериальные полиненасыщенные жирные кислоты, являясь прекурсорами веществ, потенциально имеющими биологическую активность, представляют интерес в качестве решения проблемы антибиотикорезистентности в связи с возможностью получения новых антибиотических соединений.

Литература

1. Ibrahim S.R.M., Abdallah H.M., El-Halawany A.M. et al. Naturally occurring thiophenes: isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. *Phytochem Rev* 15, 197–220 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9403-7>.
2. Mishra N. Sachan N. Kumar I. Mishra and P. Chand, J. Thiophene Scaffold as Prospective Antimicrobial Agent: A Review: Thiophene as Antimicrobial Agent: A Review. *Heterocycl.Chem.*, 55, 2019 (2018);<https://doi.org/10.1002/jhet.3249>.
3. Shah A.M., Yang W., Mohamed H., Zhang Y., Song Y. Microbes: A Hidden Treasure of Polyunsaturated Fatty Acids. *Front Nutr.* 2022 Mar 17;9:827837. doi: 10.3389/fnut.2022.827837. PMID: 35369055; PMCID: PMC8968027.

Характеристика нового штамма *Pseudomonas putida* Ch2 – деструктора токсичных антропогенных соединений *epsilon*-капролактама и глифосата

Есикова Т.З., Анохина Т.О., Сузина Н.Е., Шушкова Т.В., Соляникова И.П.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
das3534@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38727

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, плазмиды биодеградации, *epsilon*-капролактам, глифосат, полигидроксиалканоаты, ультраструктурная организация клеток.

Из почвенных проб, загрязненных отходами агрохимического предприятия (поселок Воскресенское, Нижегородская обл., Россия), выделен штамм Ch2, обладающий уникальной способностью утилизи-

ровать токсичные антропогенные соединения *epsilon*-капролактам (КАП) в качестве единственного источника углерода и энергии и гербицид широкого спектра действия глифосат (ГФ) в качестве единственного источника фосфора. На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамм Ch2 был отнесен к виду *Pseudomonas putida*. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *P. putida* Ch2 помещена в GenBank под номером ON203962. Штамм *P. putida* Ch2 депонирован в ВКМ под номером VKM B-3631D.

Исследуемый штамм рос в диапазоне концентраций КАП от 0.5 до 5.0 г/л, а также утилизировал 6-аминогексановую и адипиновую кислоты, которые являются интермедиатами катаболизма КАП. Способность к биодеградации КАП у штамма Ch2 детерминируется конъюгативной мегаплазмидой размером около 550 т.п.н.

Методом ВЭЖХ показано, что при культивировании штамма Ch2 в минерально-солевой среде с ГФ (500 мг/л) в качестве источника фосфора наиболее интенсивное потребление гербицида происходит в стадии активного роста культуры. При этом в фазе замедления роста происходит накопление аминометилфосфоновой кислоты, что указывает на то, что первичным сайтом атаки ГФ является C-N связь. Рост в присутствии ГФ уже на начальной стадии его деградации сопровождается уникальными субстратзависимыми перестройками в цитоплазме клеток с формированием везикул цитоплазматической мембранны со специфическим электронноплотным содержимым. Дискутируется вопрос, не являются ли эти мембранные образования аналогом метаболосом, в которых может осуществляться процесс первичной деградации гербицида.

Отличительной особенностью штамма *P. putida* Ch2 является способность к формированию включений полигидроксиалаконоатов (ПГА) при культивировании на минеральной среде с ГФ. Уже на начальных этапах роста в цитоплазме клеток выявляются скопления мелких и среднего размера включений ПГА, количество и размеры которых резко возрастают в логарифмической фазе роста. Скорее всего, синтез чрезмерного количества ПГА является защитной реакцией клеток на стрессовые условия культивирования в присутствии токсичного соединения.

Способность охарактеризованного в данной работе штамма *P. putida* Ch2 разлагать широкий спектр синтетических субстратов и синтезировать ПГА указывает на перспективы его использования для очистки сточных вод производства КАП и его интермедиатов, биоремедиации загрязненных глифосатом почв, а также для микробного синтеза ПГА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-54-80003).

Биосинтез лимонной кислоты из глюкозных сиропов у дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Камзолова С.В., Алмаяров Р.К., Миронов А.А., Лунина Ю.Н., Самойленко В.А.

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38728

Ключевые слова: микробный синтез, лимонная кислота, дрожжи *Yarrowia lipolytica*, глюкозные сиропы.

Интерес к биосинтезу лимонной кислоты (ЛК) и её производным связан с их широким применением в различных сферах производства. До настоящего времени ЛК получают при использовании гриба *Aspergillus niger* и свекловичной или тростниковой мелассы. Основными достоинствами использования гриба *A. niger* являются: простота поддержания штаммов-продуцентов в активном состоянии; высокая

концентрация и удельная скорость синтеза ЛК; разработанные питательные среды и условия культивирования и др. К недостаткам технологии получения ЛК с использованием гриба *A. niger* относят то, что меласса, будучи отходом от производства сахара, обычно содержит до 44–54% ферментируемого сахара, 20% воды, а остальное – органические и неорганические вещества, которые не могут быть превращены в ЛК. Следовательно, максимальный выход ЛК из мелассы обычно находится в пределах 50% от потребленной мелассы. Также предусматривается обязательная обработка мелассы ферроцианидами для удаления избыточного содержания микроэлементов. Данный процесс производства ЛК является экологически небезопасным. Производство ЛК с использованием гриба *A. niger* связано с накоплением значительного количества твёрдых и жидких отходов, на утилизацию которых необходимы значительные затраты. В процессе производства с использованием гриба *A. niger* в воздушной смеси на производстве присутствуют споры гриба, которые являются сильными аллергенами и могут вызывать различные заболевания органов дыхания у человека, например аспергиллёз [1].

В ИБФМ РАН разработаны технологии получения ЛК с использованием дрожжей *Yarrowia lipolytica* из различных источников углерода, в том числе, этанола, глюкозы, глицерина, растительных масел, отходов производства биодизеля.

К малоизученным источникам углерода относятся глюкозные сиропы, которые получаются из крахмалсодержащего зернового сырья (пшеница, рожь, тритикале, ячмень). Их изучение актуально в связи с существующей потребностью глубокой переработки зерновых культур в продукты с высокой стоимостью. Глюкозные сиропы содержат в своём составе глюкозу и фруктозу. Показано, что при дефиците азота в среде с глюкозой дрожжи *Y. lipolytica* синтезируют 100–111 г/л ЛК [2, 3], а в среде с фруктозой – 65 г/л [4].

Целью данной работы было изучение возможности получения ЛК из глюкозных сиропов, содержащих в своём составе глюкозу и фруктозу; определение кинетических и балансных соотношений в процессе кислотообразования.

В качестве объектов исследования использовали природные штаммы *Yarrowia lipolytica* ВКМ Y-2373, *Y. lipolytica* ВКМ Y-2412 и мутант *Y. lipolytica* № 15. Сырьё для проведения синтеза являлся глюкозный сироп, имеющий состав: содержание глюкозы, массовая доля, %: 92; содержание фруктозы, массовая доля, %: 2; массовая доля сухих веществ, %: 70,0 – 72. Культивирование проводили в колбах и в ферментёре в режиме fed-batch на минеральной среде Ридер при температуре 28 °C и аэрации 20–40% (от насыщения). pH = 6 поддерживали добавлением 20%-ного раствора NaOH. Синтез ЛК обеспечивался лимитированием роста клеток источником азота. Время культивирования – 118 ч. Содержание сырой биомассы оценивали по весу. Концентрацию ЛК и других кислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Показано, что исследуемые штаммы хорошо росли на среде с глюкозным сиропом и синтезировали ЛК. Однако количество ЛК у исследуемых дрожжей варьировало от 3,9 до 6,7 г/л. Кроме ЛК в среде обнаружены изолимонная кислота (ИЛК) (не более 10% от суммы кислот) и другие кислоты (фумаровая, яблочная, пировиноградная) в следовых количествах. Природный штамм *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 с максимальным накоплением ЛК (6,7 г/л) был отобран для работы в ферментёре.

В табл. 1 представлены сравнительные данные по биосинтезу ЛК в среде с глюкозным сиропом и глюкозой в 10-ти л ферментёре АНКУМ-2М с рабочим объемом 5 л. В среде с глюкозным сиропом в условиях дефицита азота дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 синтезировали 57,7 г/л ЛК с выходом про-

Таблица 1

Показатели роста и биосинтеза ЛК у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373

Источник углерода	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	Y _{ЛК} – отношение выхода ЛК к затратам		Q _{ЛК} (г/л·ч)	q _{ЛК} – производительность синтеза в пересчете на (г/г·ч)	
			сырья (г/г)	глюкозы (г/г)		сырьё	глюкозу
Глюкозный сироп	59,8	57,7	0,24	0,37	0,50	0,002	0,003
Глюкоза	50,8	73,3	–	0,78	0,81	–	0,05

дукта ($Y_{ЛК}$) 0,24 г/г к затратам сырья и 0,37 г/г к затратам глюкозы; объёмная продуктивность составляла – 0,5 г/л·ч, а производительность синтеза – 2 мг/г·ч в пересчете на сырье и 3 мг/г·ч в пересчете на глюкозу. В среде с очищенной глюкозой показатели синтеза были выше: 73,3 г/л ЛК; выход продукта ($Y_{ЛК}$) – 0,78 г/г; объемная продуктивность – 0,81 г/л·ч и производительность синтеза – 50 мг/г·ч в пересчете на глюкозу.

Второй продукт ферментации – биомасса дрожжей. Выход ($Y_{X/S}$) и производительность синтеза биомассы дрожжей ($Q_{X/S}$) составляют 0,24 г/г в пересчете на сырье и 0,52 г/л·ч, соответственно.

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность получения ЛК из глюкозных сиропов с использованием дрожжей *Y. lipolytica*. Дальнейшая работа будет направлена на оптимизацию условий культивирования дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 в среде с глюкозным сиропом.

Литература

1. Igliński et al. Clean Technol. Envir. 2022, 1–19.
2. Tan et al. Bioprocess Biosyst. Eng. 2016, 39, 1289–1296.
3. Fu et al. Mar. Biotechnol. 2016, 18, 1–14.
4. Yalcin et al. Food Biotechnol. 2009, 23(3), 266–283.

Биодеградативный потенциал штаммов-деструкторов хлорбифенилов кmono-гидроксилированному бифенилу

Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
kitadi2101@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38729

Ключевые слова: аэробные бактерии, деструкция, гидрокси-бифенил

В условиях бурного развития промышленности в XX в. были созданы вещества с необходимыми химическими и физическими характеристиками, однако, являющиеся высоко опасными для живых организмов. Обширные исследования позволили выделить группу соединений, особо вредных для природы, но при этом, высоко устойчивых к физическим и химическим воздействиям. В начале нынешнего столетия был принят международный документ, ратифицированный на данный момент более чем 170 странами, в котором в группу стойких органических загрязнителей были включены 12 веществ и группы веществ (Final act..., 2001). Позже список был расширен. В первоначальный список были включены полихлорированные бифенилы (ПХБ). Масштаб загрязнения природных сред данными веществами трудно оценить. В настоящее время ПХБ выявляются не только в местах производства и складирования, но и в песках Сахары, и во льдах Арктики и Антарктики (Negret-Bolagay et al., 2021). В связи с этим, актуальным является вопрос их уничтожения в объектах окружающей среды.

Известно, что под давлением лимитирующих факторов в биоценозах происходит естественный отбор, преимущество в котором получают особи, устойчивые к воздействующему фактору. Высокий уровень микробного разнообразия в почвах и донных отложениях, в том числе загрязненных ПХБ, позволил микробиоценозам адаптироваться к негативному воздействию данного загрязнителя. Как показали исследования последних десятилетий, аэробные и анаэробные бактерии обладают высоким биодеградативным потенциалом в отношении хлорированных бифенилов (Elangovan et al., 2019; Negret-Bolagay et al., 2021). Однако, в результате их деятельности в природе появились так называемые вторичные поллютанты – вещества, которые образуются на разных стадиях биотрансформации ПХБ, проникающие в

окружающую среду и обладающие опасными свойствами для животных и человека. К такой категории соединений относятся гидроксилированные производные бифенила/ПХБ (Tehrani, Van Aken, 2014).

Цель настоящей работы – оценить возможность разложения гидроксилированного бифенила (с одной гидрокси-группой в молекуле) штаммами, обладающими деградативной активностью по отношению к хлорированным бифенилам.

В работе использованы штаммы рабочей коллекции Лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН»: *Pseudomonas* sp. PNB3, *Brevibacterium* sp. PNB5, *Achromobacter* sp. PNB6, *Bosea* sp. PNB7, *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *Stenotrophomonas* sp. PNS6. Данные штаммы эффективно разлагают хлорированные бифенилы (Egorova et al., 2021). Способность к разложению 3-гидрокси-бифенила (3-ГБ) изучали в эксперименте с отмытыми клетками (минеральная среда K1, оптическая плотность культуры при длине волн 600 нм – 1,5 о.е., конечная концентрация моногидрокси-бифенила – 0,5 г/л).

Установлено, что штаммы проявляли разную деградативную активность к 3-ГБ (рис.). По эффективности деструкции штаммы можно разделить на три группы:

- низкая активность – штаммы *Bosea* sp. PNB7 и *Ochrobactrum* sp. PNS5, удельная скорость деструкции $0\text{--}0,51 \text{ сут}^{-1}$, эффективность деструкции 0–7,2%;
- средняя активность – штаммы *Pseudomonas* sp. PNB3, *Achromobacter* sp. PNB6 и *Stenotrophomonas* sp. PNS6, удельная скорость деструкции $1,53\text{--}2,31 \text{ сут}^{-1}$, эффективность деструкции 21,4–32,5%;
- высокая активность – штаммы *Micrococcus* sp. PNS1 и *Brevibacterium* sp. PNB5, удельная скорость деструкции $6,88\text{--}7,01 \text{ сут}^{-1}$, эффективность деструкции 96,4–98,2%.

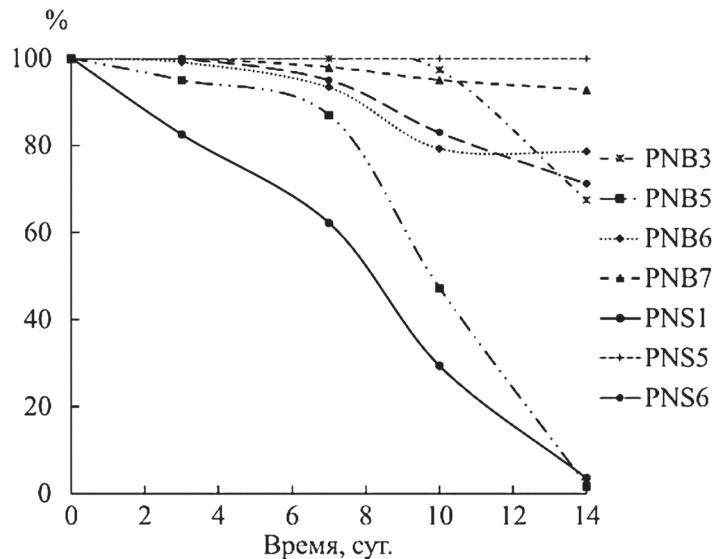


Рис. Изменение концентрации 3-гидрокси-бифенила под действием аэробных штаммов-деструкторов

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что не все штаммы-деструкторы ПХБ обладают деградативным потенциалом в отношении моногидроксилированного бифенила, не смотря на структурную схожесть молекул химических соединений.

Наибольшим биодеградативным потенциалом в отношении 3-гидрокси-бифенила среди исследованных в настоящей работе штаммов характеризуются *Micrococcus* sp. PNS1 и *Brevibacterium* sp. PNB5. Данные штаммы могут быть рекомендованы для использования в биотехнологиях, направленных на восстановление территорий, загрязненных как хлорированными, так и гидроксилированными бифенилами.

Литература

1. Egorova D., Kyr'yanova T., Pyankova A., Anan'ina L., Plotnikova E. Selective pressure of biphenyl/polychlorinated biphenyls on the formation of aerobic bacterial associations and their biodegradative potential // Folia Microbiologica. 2021. V. 66. P. 659–676.
2. Elangovan S., Pandian S.B.S., S.J.G., Joshi S.J. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Fate, Challenges and Bioremediation // Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. 2019. P. 165–188.

- Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm, 22–23 May // UNEP / POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme. Geneva. 2001. 44 p.
- Negrete-Bolagay D., Zamora-Ledezma C., Chuya-Sumba C., De Sousa F.B., Whitehead D., Alexis F., Guerrero V.H. Persistent organic pollutants: the trade-off between potential risks and sustainable remediation methods. // Journal of Environmental Management. 2021. V. 300. Article 113737.
- Tehrani R., Van Aken B. Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: source, fate, and toxicities // Environmental Science of Pollution Research. 2014. V. 21. P. 6334–6345.

Выделение из нефтезагрязненных почв Томской области нового штамма *Penicillium* sp. I22 и изучение его потенциала для биоремедиации

Климашов И.С.¹, Иvasенко Д.А.^{1,2}, Глухова Л.Б.^{1,2}, Герасимчук А.Л.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет

² ООО «Дарвин» GLB122@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38730

Ключевые слова: аскомицеты, углеводороды, экзоферменты, нефть.

Загрязнения углеводородами (УВ) нефти и её производными по-прежнему остается актуальной проблемой (Kumar et al., 2023; Hkiri et al., 2023). Загрязнение нефтепродуктами происходит не только при крупных техногенных авариях, но и локально, в местах ремонта техники, её эксплуатации, судоходства (Hkiri et al., 2023). Для очистки почв от загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) нефти применяются биопрепараты на основе бактерий родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium* и др. (Homenko & Nogina, 2015). Микроорганизмы, входящие в основу биопрепаратов для биоремедиации часто обладают свойством переводить сложные и длинные ПАУ в менее токсичные формы или использовать их в качестве единственного источника энергии. Тем не менее, на биоразложение УВ нефти может влиять множество абиотических и биотических факторов, которые ограничивают применение препаратов-нефтедеструкторов. Ограничительным фактором может выступать и состав нефти (Бухарина и др., 2022). Преимуществом использования грибов при восстановлении загрязненных нефтью земель является разнообразие их ферментативного комплекса, способности формировать связи, возникающие между высшими растениями и микромицетами, что оказывают значительное влияние на развитие представителей обеих групп, а также на показатели плодородия почв и процессы обмена биогенными элементами (Бухарина и др., 2022). Для *Cylindrocarpon magnusianum*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium citrinum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraconiothyrium variabile* и др. показана способность к нефтедеструкции (Позднякова и др., 2019; Бухарина и др., 2022; Kumar et al., 2023; Hkiri et al., 2023). Таким образом, поиск, выделение и изучение новых потенциальных нефтеразрушающих микромицетов является актуальной задачей.

Из загрязненных нефтяными разливами почв севера Томской области выделен в чистую культуру изолят *Penicillium* sp. I22. Выделение проводили на минеральной среде MSM (Позднякова и др., 2019) с нефтью (1%), на начальных этапах вносили антибиотики стрептомицин (100 мг/л), канамицин (100 мг/л) (рис. 1). Видовую идентификацию проводили по трем локусам: регион ITS1-5.8S-ITS2, и частичным последовательностям генов кальмодулина и β-тубулина. Нуклеотидный анализ показал, что гомология с *Penicillium citrinum* по региону ITS (MK736919) составила 99.80%, β-тубулину (OP660621) – 100%, кальмодулину (KP330179) – 99.64%. На филогенетическом дереве изолят попадал в группу *P. citrinum* (Рисунок 2). Таким образом, выделенный изолят является новым штаммом *P. citrinum* sp. I22.

Изучена эмульгирующая активность (Kumar et al., 2023) *Penicillium* sp. I22, которая варьировала в диапазоне 48–74% на 3, 6, 10 и 12 сутки.

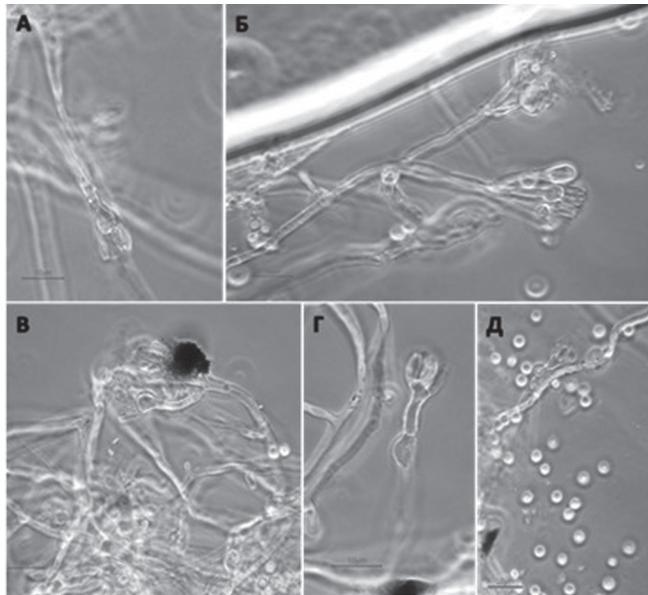


Рис. 1. Морфология мицелия и конидиеносцев (А–Г), спор (Д) изолята *P. citrinum* sp. I22

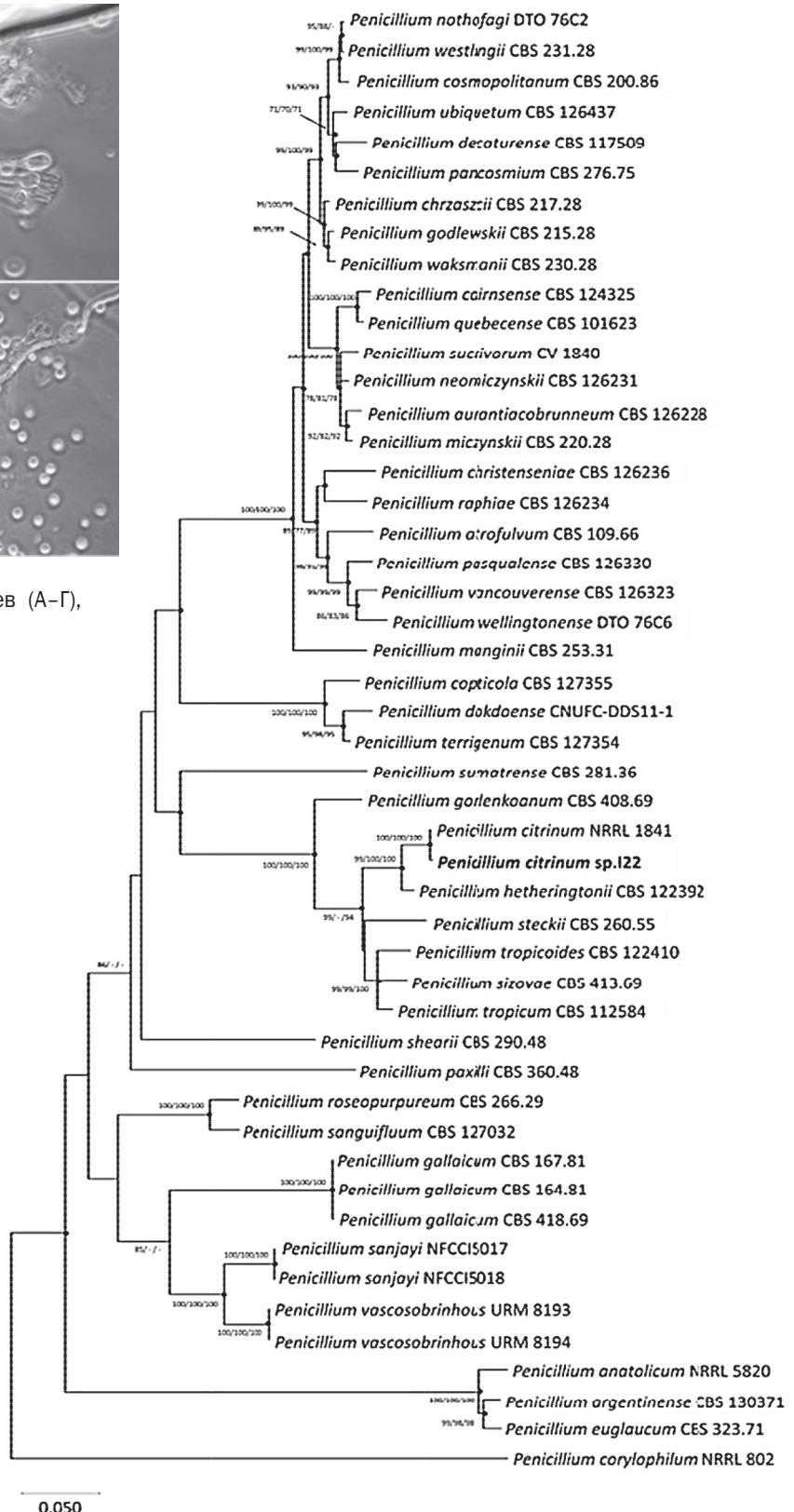


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе объединенных данных нуклеотидных последовательностей региона ITS1-5.8S-ITS2, тубулина и кальмодулина, бутстреп 1000. Цифры на ветвях показывают поддержку бутстрепа для ML/NJ/ME, соответственно. Значения менее 70 показаны прочерком

Таким образом, полученный штамм *Penicillium citrinum* sp. I22 обладает потенциалом для использования в процессах ремедиации при разливах нефти.

Работа выполнена при поддержке Гранта № 075-15-2022-1152 (Постановление № 619, от 8.04.2022 г.).

Литература

1. Бухарина И.Л., Исупова А.А., Лямзин В.И., Лебедева М.А. 2022. Перспективы использования консорциумов микроорганизмов и высших растений в восстановлении нефтезагрязненных земель // Лесной вестник. Т. 26, № 6, С. 14–23. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-6-14-23
2. Позднякова Н.Н., Баландина С.А., Турковская О.В. 2019. Деградативная активность грибов по отношению к углеводородам нефти в условиях повышенной температуры // Теоретическая и прикладная экология, № 4. С. 69–75. DOI: 10.25750/1995-4301-2019-4-069-075
3. Хоменко Л.А., Ногина Т.М. 2015. Микробная деструкция минеральных (нефтяных) масел // Мікробіол. журн., 2015, Т 77, № 6. DOI: 10.15407/microbiolj77.06.070
4. Kumar V., Kumar H., Vishal V., Lal S. 2023. Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of *Penicillium citrinum* and *Paecilomyces variotii* (Eurotiales) from oil-contaminated areas // Archives of Microbiology V. 205, # 50. DOI: 10.1007/s00203-022-03383-x
5. Hkiri N., Aounallah F., Fouzai K., Chouchani C., Asses N. 2023. Ability of marine-derived fungi isolated from polluted saline environment for enzymatic hydrocarbon remediation // Brazilian Journal of Microbiology, V. 54. P. 1983–2000. DOI: 10.1007/s42770-023-01049-4

Новая грибная стероид-7-гидроксилаза: идентификация гена и функциональная экспрессия в *Pichia pastoris*

Коллеров В.В., Тарлачков С.В., Шутов А.А., 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.2023.17.38731

Ключевые слова: стероиды, идентификация гена, экспрессия, *Pichia pastoris*.

Стероиды – циклические органические соединения, широко представленные в животном и растительном мире. В настоящее время одними из наиболее востребованных реакций функционализации стероидного ядра являются реакции регио- и стереоспецифического гидроксилирования, необходимые при получении гидрокстериоидов, обладающих рядом ценных терапевтических свойств (Durairaj et al., 2016). Использование химического синтеза при получении востребованных гидроксилированных стероидов, как правило, характеризуется многостадийностью процесса, низкими выходами целевых продуктов и рисками загрязнения окружающей среды. Перспективным решением проблемы является использование микроорганизмов в качестве биокатализаторов реакций гидроксилирования, и здесь на первый план выходят представители низших эукариот – мицелиальные грибы, которые часто являются источником уникальных P450 монооксигеназ, способных к введению гидроксильных групп в различные положения стероидного ядра (Kristan and Rízner 2012; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015).

Ранее, в ходе широкого скрининга микромицетов на наличие стероид-трансформирующей активности, нами был выявлен аскомицетный штамм *Curvularia* sp. ВКМ F-3040, проявляющий крайне редкую для мицелиальных грибов 7β-гидроксилазную активность в отношении андростадиенона (АДД) и дегидроэпиандростерона (ДГЭА), продуцируя ценные стероидные метаболиты 7β-ОН-АДД и 7β-ОН-ДГЭА (Kollerov et al., 2020; Kollerov et al., 2022). Предварительный транскриптомный анализ клеток мицелия позволил определить кандидатный ген цитохрома P450 с максимально высоким уровнем экспрессии в ответ на индукцию клеток мицелия стероидом ДГЭА (Kollerov et al., 2023).

Целью настоящего исследования являлась функциональная идентификация кандидатного гена грибной P450 7-монооксигеназы путём его клонирования и гетерологической коэкспрессии с геном его природного редокса партнёра в клетках дрожжей *Pichia pastoris*.

Среди транскриптов грибного штамма *Curvularia* sp. был найден ген *cpr*, кодирующий синтез НАДФН-цитохрома Р450 редуктазы (CPR). Следует отметить, что уровень экспрессии гена *cpr* согласно данным транскриптомного анализа в клетках контрольного и индуцированного ДГЭА мицелия был сопоставим, что свидетельствует в пользу конститутивной природы фермента. Нами была выбрана стратегия по созданию на основе плазмидных векторов pBluescriptII KS (+) и pPICZA бицистронной экспрессионной кассеты двух целевых генов с введенной между ними последовательностью, кодирующей синтез T2A элемента – пептида длиной 21 аминокислотный остаток из участка 2A генома вируса *Thosea asigna* и способного к самовырезанию из полипептидной цепи на этапе трансляции (вырезание начинается с разрыва пептидной связи между остатками пролина (P) и глицина (G) на C-конце 2A-пептида), тем самым приводя к синтезу двух независимых белков в эквимолярных количествах. При этом в качестве шасси для гетерологической коэкспрессии грибных генов CYP_{cur} и CPR были выбраны клетки дрожжей *Pichia pastoris*.

На основе тотальной РНК, выделенной из клеток индуцированного стероидом мицелия *Curvularia* sp. с использованием обратной транскриптазы была синтезирована первая цепь кДНК и амплифицированы кДНК последовательности генов CYP_{cur} и CPR. Амплифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор pBluescriptII KS (+) с получением в итоге рекомбинантной плазмида pBluescript SK II (+)-CYP_{cur}-CPR, несущий последовательность бицистронной конструкции целевых грибных генов. Полученная конструкция была переклонирована в экспрессионный дрожжевой вектор pPICZA под контроль метанол-индуцируемого алкоголь оксидазного промотора *AOX1* с отбором положительных трансформантов *E. coli* DH5α-pPICZA-CYP_{cur}-CPR на среде с селективным антибиотиком зеочином (25 мкг/мл).

Следующий этап работы был направлен на интеграцию рекомбинантной плазмида pPICZA-p450cur-CPR в дрожжевую хромосому методом гомологичной рекомбинации (одиночный кроссинговер). Для этого были получены электрокомпетентные клетки *Pichia pastoris* и проведена их электротрансформация рекомбинантной плазмидой pPICZA-P450cur-CPR с отбором положительных трансформантов на среде с селективным антибиотиком зеочином в различных концентрациях (100–2000 мкг/мл).

Для оценки функциональной активности рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, гетерологически коэкспрессирующих грибные гены CYP_{cur} и CPR была проведена трансформация двух стероидных субстратов: АДД и ДГЭА (0.2 г/л). Результаты исследования показали, что в случае использования контрольного штамма *P. Pastoris*, несущего пустой плазмидный вектор, для трансформации АДД и ДГЭА, образования каких-либо 7-гидроксилированных производных в среде конверсии на протяжении всего времени инкубации не наблюдалось. В то же время, в среде конверсии стероидных субстратов рекомбинантными штаммами *P. pastoris* GS115-pPICZA-CYP_{cur}-CPR, несущими плазмидный вектор со встроенной в него бицистронной конструкцией грибных генов CYP_{cur} и CPR детектировали накопление 7-гидроксилированных производных, основные из которых были идентифицированы, как 7β-ОН-АДД и 7β-ОН-ДГЭА, соответственно, с максимальным выходом до 25–28% (моль/моль) в неоптимизированных условиях.

Таким образом, в ходе настоящей работы с использованием транскриптомного анализа, клонирования и гетерологической экспрессии идентифицирован ген новой грибной стероидной 7-гидроксилазы и получены рекомбинантные дрожжевые продуценты ценных 7β-гидроксилированных производных стероидов андростанового ряда.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 21-64-0024).

Литература

1. Durairaj P., Hur J., Yun H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb Cell Fact* 15:125.
2. Kristan K., Rizner 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.
4. Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. (2020) Biotransformation of androstenedione and androstanedione by selected Ascomycota and Zygomycota fungal strains. *Phytochemistry* 169:112160.

5. Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. (2022) Steroid modification by filamentous fungus *Drechslera* sp.: Focus on 7-hydroxylase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Fungal Biology* 126:91-100.
6. Kollerov V.V., Tarlachkov S.V., Donova M.V. (2023) *De novo* transcriptome assembly of *Curvularia* sp. VKM F-3040, a promising steroid-modifying ascomycete. *Microbiol Resour Announc*. <https://doi.org/10.1128/MRA.00663-23>.

**Стимулирующее действие липополисахаридов
диазотрофных ризобактерий *Azospirillum soli* CC-LY788(T)
и *Azospirillum griseum* L-25-5 w-1
на ранних стадиях роста *Triticum aestivum* L.**

Кондюрина Н.К.¹, Федоненко Ю.П.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное
подразделение Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»
natasha.kondyrina@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38732

Ключевые слова: пшеница, *Azospirillum*, липополисахарид

Бактерии рода *Azospirillum* – диазотрофные грамотрицательные симбиотические альфа-протеобактерии, модельный объект для изучения растительно-микробных ассоциаций. Рост-стимулирующий потенциал азоспирилл обусловлен способностью продуцировать биологически активные вещества: фитогормоны, сидерофоры, ферменты и органические кислоты, а также осуществлять фиксацию атмосферного азота, солюбилизацию фосфатов и повышать системную устойчивость растения-хозяина к патогенам. В ассоциативные отношения *Azospirillum* spp. вступают преимущественно с представителями семейства Мятликовые (Poaceae), среди которых – высокопродуктивные ценные сельскохозяйственные виды пшеница, рожь, овёс, рис, кукуруза, ячмень, просо, сахарный тростник.

Взаимодействие *Azospirillum* – растение обеспечивается за счёт макромолекул бактериальной поверхности, в основном – липополисахаридов наружной мембранны (ЛПС). ЛПС – трёхкомпонентные макромолекулы, представленные гидрофобным остовом – липидом А, олигосахаридным коровым фрагментом и наиболее вариативной структурой – О-специфическим полисахаридом (ОПС).

В данной работе рассмотрено влияние ЛПС типовых штаммов двух новых видов азоспирилл – *Azospirillum soli* CC-LY788(T), выделенного из сельскохозяйственного грунта в Тайване в 2015 г. [1], и *Azospirillum griseum* L-25-5 w-1, выделенного в 2019 г. из образцов воды из озера Байян (Китай) [2], на проростки пшеницы *Triticum aestivum* L.

Бактериальную культуру выращивали до экспоненциальной фазы роста в жидкой синтетической малатной среде. Осаждённые центрифугированием бактериальные клетки промывали 0,9% NaCl на протяжении 3 суток с ежедневной заменой промывающего раствора. Объединённые супернатанты концентрировали и диализировали против дистиллированной воды. Из высущенных ацетоном и измельчённых клеток экстрагировали ЛПС по модифицированному методу Вестфала без разделения водного и фенольного слоев [3]. Примесные белки осаждали 40% трихлоруксусной кислотой, титруя pH раствора до значения 2,7. Диализом удаляли низкомолекулярные соединения, диализат концентрировали и лиофилизовали (BenchTop 2K «VirTis», США).

Пшеницу замачивали в деионизованной воде для набухания, промывали раствором поверхностно активного вещества, делипидировали обработкой 96% этанола (30 сек) и стерилизовали раствором ди-

оцида (5 мин). Зерновки помещали на бумажные диски в чашки Петри, смоченные жидкой питательной средой для растений, приготовленной из расчёта KH_2PO_4 0,7 г/л, K_2HPO_4 0,5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 г/л, Na_2SO_4 0,1 г/л, NH_4Cl 0,134 г/л, (рН 6,7), инкубировали в течение 2 суток, после чего проросшие семена переносили на идентичную плотную среду и инкубировали ещё 2 суток в термостатируемых условиях при 26 °C. Четырёхсуточные проростки переносили в стерильные контейнеры с жидкой питательной средой для растений. Препараты ЛПС вводили в среду на 7 день инкубации для достижения конечной концентрации 125 мкг/мл, через 3 суток у проростков фиксировали изменение биохимических и морфологических показателей. Определяли митотический индекс после фиксации кончиков корней в растворе Карнума. Окрашивание осуществляли гематоксилином в течение 1 ч, затем пробы помещали в цитазу на 1 час. Готовые препараты микроскопировали на лазерном диссекторе Leica LMD 7000 (Leicamicrosystems, Германия). Было зафиксировано повышение митотического индекса в 1,5 и 2,2 раза для корней, инокулированных ЛПС *A. soli* и *A. griseum* соответственно. Для определения содержания крахмала в корнях использовали метод, предложенный Takeshita [4]. Измерение оптической плотности растворов, полученных водной экстракцией из корневой массы, проводили на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия) при 660 нм. Данные, полученные для контрольной и экспериментальных групп, позволяют говорить об отсутствии статистически значимых отличий в содержании крахмала в корнях пшеницы, инкубированной в среде с добавлением ЛПС.

В то время как значения сырой массы побегов и корней исследуемых проростков были сопоставимы, было отмечено влияние бактериальных гликополимеров на площадь листовых пластинок. В ответ на присутствие в среде ЛПС у проростков пшеницы было обнаружено значительное увеличение площади фотосинтезирующей поверхности – на 20,7% (инокуляция ЛПС *A. soli*) и 45,1% (инокуляция ЛПС *A. griseum*). Измерения данного показателя производили с использованием приложения Petiole.

Расчёт содержания пигментов зелёного листа – хлорофиллов и каротиноидов – осуществляли по методу Вельбурн [5]. Корреляция между наличием в среде ЛПС и содержанием хлорофиллов а и в не была отмечена, однако наблюдалось повышение количества каротиноидов – их содержание возрастало на 41,37% для ЛПС *A. soli* и 40,53% для ЛПС *A. griseum*.

Таким образом, представленные результаты позволяют предположить, что в основе биохимические и морфофизиологические изменения, зафиксированные у проростков пшеницы в присутствии в среде ЛПС, носят адаптационный характер (повышение содержания каротиноидов и возрастание показателя митотического индекса свидетельствуют о воздействии стрессового фактора), сопровождающийся стимуляцией ростовых процессов (активизация апикальных меристем и увеличение площади листовой поверхности).

Литература

1. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil / L. Shih-Yao [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – V. 65 – P. 4601–4607.
2. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater / Y. Yang [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2019. – V. 69 – P. 3676–3681.
3. Westphal O. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure / Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – V. 5 – P. 83–91.
4. A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae / T. Takeshita [et al.] // Cytologia. – 2015. – V. 80 – P. 475–481.
5. Wellburn R.A. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / Journal of Plant Physiology. – 1994. – V. 144 – P. 307–313.

Поиск штаммов-деструкторов бифенила в нефтезагрязненных биотопах

Королёв Н.А., Егорова Д.О.

Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН)
nicolay.korolyov@outlook.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38733

Ключевые слова: бифенил, ПХБ, штаммы, деструкция, нефтяное загрязнение.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) входят в группу стойких органических загрязнителей (СОЗ). ПХБ являются высокотоксичными органическими соединениями, которые надолго сохраняются в окружающей среде и накапливаются в жиро содержащих компонентах (Габдулхакова и др., 2016). Обладая уникальными теплофизическими и диэлектрическими свойствами, ПХБ использовались во всех промышленно развитых странах с конца 20-х гг. прошлого столетия. За это время производство ПХБ различных марок составило более 1 млн тонн. В 70-х гг. ХХ в. установлено, что ПХБ являются токсичными канцерогенными соединениями, обладают длительным периодом полураспада в условиях окружающей среды, способны к трансграничному переносу на большие расстояния по воздуху, воде и пищевым цепям. По решению Стокгольмской конвенции 2001 г. ПХБ и другие стойкие органические загрязнители (СОЗ), должны быть изъяты из эксплуатации до 2015 г., а до 2028 г. – уничтожены. Российская Федерация ратифицировала решение конвенции в 2011 г. (<https://chm.pops.int>). Основной химической структуры ПХБ является незамещенный бифенил, состоящий из двух ароматических колец, соединенных С-С связью (Горбунова и др., 2018). Известно, что соединения ароматической природы входят в состав нефти и сопровождающих их рассолов (Егорова и др., 2022). В связи с этим, возникает предположение, что в результате селекции, происходящей под давлением нефтяного загрязнения, в микробиоценозах могут получить преимущество в развитии штаммы, активно разлагающие ароматические углеводороды.

Цель исследования – выделение из нефтезагрязненных биотопов и описание аэробных бактериальных штаммов, использующих бифенил в качестве единственного источника углерода.

Образцы почвы и донных отложений были отобраны на реке Каменка (Пермский край, Кокуйское газонефтяное месторождение) 27.10.2022 г. Биотопы данного района находятся под влиянием многолетнего нефтяного загрязнения.

В результате накопительного культивирования на минеральной среде K1 в присутствии бифенила и последующего выделения чистых культур, было получено 45 штаммов аэробных бактерий, способных использовать бифенил в качестве ростового субстрата. Анализ результатов экспериментов по периодическому культивированию на минеральной среде K1 с бифенилом (0,5 г/л) в качестве единственного источника углерода показал, что наиболее перспективными являются штаммы V_00 a1, V_DO_12 a1, V_DO_12 a2 и V_DO_12 a3 (рис.).

Удельная скорость роста штаммов V_00 a1, V_DO_12 a1, V_DO_12 a2 и V_DO_12 a3, при культи-

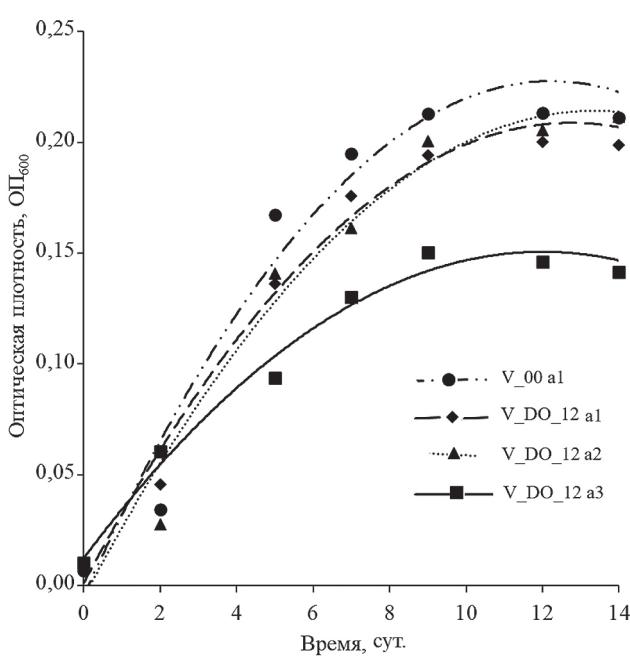


Рис. Динамика роста штаммов в жидкой минеральной среде K1 с бифенилом ($R^2 = 0,959-0,986$)

вировании в минеральной среде с бифенилом составила 0,383 сут⁻¹, 0,352 сут⁻¹, 0,344 сут⁻¹ и 0,299 сут⁻¹ соответственно.

Таким образом, из нефтезагрязненных биотопов выделены аэробные штаммы бактерий, способные разлагать бифенил и использовать его в качестве единственного источника углерода.

Работа выполнена в рамках госзадания AAAA-A19-119112290009-1 «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды».

Литература

1. Габдулхакова И.Р., Каюмова А.Ф., Самоходова О.В. Влияние различных доз полихлорированных бифенилов на состояние спонтанной и индуцированной иммуноглобулином люминолзависимой хемилюминесценции цельной крови // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11, № 1 (61). С. 129–132.
2. Горбунова Т.И., Первова М.Г., Салоутин В.И., Чупахин О.Н. Химическая функционализация полихлорированных бифенилов. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2018. 728 с.
3. Егорова Д.О., Бузмаков С.А., Санников П.Ю., Шестаков И.Е., Хотяновская Ю.В. Биоремедиационный потенциал природного микробиоценоза в условиях хронического нефтяного загрязнения // Экология и промышленность России. 2022. Т. 26, № 11. С. 60–65.

Выделение пептидов микробиоты кишечника из сыворотки и плазмы крови здоровых доноров

Косс В.А., Арапиди Г.П.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва
kossvalery@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38734

Ключевые слова: пептиды микробиоты кишечника, ВЭЖХ-МС/МС, пептиды кровотока, фрагменты микробных предшественников, посредники между микробиомом и человеком

Публикуется много научных исследований, посвященных микробиоте, однако остается много открытых вопросов касательно механизмов симбиоза бактерий и человека на уровне взаимодействия активных молекул вне кишечника. Количество разнообразных бактерий в пищеварительной системе оценивают от 200 до более 1000 видов (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014; Costea et al., 2018), а спектр метаболитов, который они производят и высвобождают в наш организм в разы больше. Нас заинтересовали проникающие за пределы полости кишечника пептиды микробиоты. Это могут быть как продукты деградации белков бактериальной природы, так и метаболиты выделяемые прокариотами во внешнюю среду. Вероятным посредником между микробиомом и тканями человека служит кровь, как соединительная ткань организма, поэтому мы стали анализировать образцы сыворотки и плазмы.

Для их исследования в нашей лаборатории был предложен метод пробоподготовки, позволяющий из 500 мкл сыворотки или плазмы крови идентифицировать до 4 тысяч уникальных пептидов. Протокол включает в себя десорбцию с помощью 6 М GuHCl низкомолекулярных белков и пептидов с поверхности крупных белков крови, например, альбумина. Затем производится ультрафильтрация молекул массой более 10 кДа и обессоливание выделенных пептидов методом обращенно-фазовой хроматографии. В данной работе была проанализирована сыворотка и плазма крови шести здоровых доноров. Анализ выделенных пептидов был проведен методом ВЭЖХ-МС/МС на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap.

Из 9224 идентифицированных пептидов 5393 были уникальными фрагментами микробных предшественников, что составляет около 24,4% от общего количества выявленных пептидов кровотока по

числу идентифицированных спектров фрагментации. В экспериментах были обнаружены наборы пептидов, воспроизводимые для всех, а также последовательности, специфичные для отдельных доноров. Масс-спектры, идентифицированные как фрагменты белков различных микроорганизмов, были отнесены к их соответствующему таксономическому уровню. Так, наиболее представленными пептидами стали продукты деградации белков таких типов как Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria и Bacteroidetes, обитающих в различных биотопах человека, в частности в микробиоте кишечника.

У пептидов микробиоты обнаруживается большое разнообразие функций. В качестве примера можно привести исследования Сергея Фетисова и его группы (Breton, 2016), которая изучает, как пептиды, продуцируемые бактериями, могут не только проникать из кишечника в кровоток, но и попадать в центральную нервную систему. В частности, речь идет о бактериальном гомологе человеческого нейропептида, альфа-меланоцит-стимулирующего гормона, который, попадая в ядра гипоталамуса, играет роль в регуляции аппетита.

Можно предположить, что кишечная микробиота человека, обладая значительными метаболическими возможностями, способна продуцировать бактериальные фрагменты, которые попадают в кровь и могут выполнять различные биологические функции, действуя на ткани и органы. В связи с этим появились такие термины как «ось кишечник–мозг» или «ось кишечник–легкие». Изучение пептидов микробиоты, их ассоциация со здоровыми и патологическими состояниями является очень перспективным направлением, ведь бактерии засчет своего разнообразия и множественности продуцируемых метаболитов обладают широким спектром возможностей для биотехнологии и регуляции жизнедеятельности организма.

Профилактическая эффективность новой комплексной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных при смешанных микотоксикозах на лактирующих коровах

Косых А.В., Мирошниченко П.В., Данильченко О.Б.

¹ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнике и ветеринарии»
krasnodarnivi@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38735

Ключевые слова: Микотоксикоз; кормовая добавка; крупный рогатый скот; удои

Разработана и предложена производству новая комплексная кормовая добавка для сельскохозяйственных животных. Кормовая добавка состоит из активированного клиноптилолита и органических кислот. Применение новой комплексной кормовой добавки благотворно влияет на удои лактирующих коров, на также биохимические показатели крови подопытных животных.

Установлено что на фоне применения ОР содержащего микотоксины (Т-2 токсин 0,02 мг/кг, зеараленон 0,5 мг/кг) новая кормовая добавка поволила увеличить надои на (8,1 %), по сравнению с контрольной группой. Результаты представлены на рис. 1.

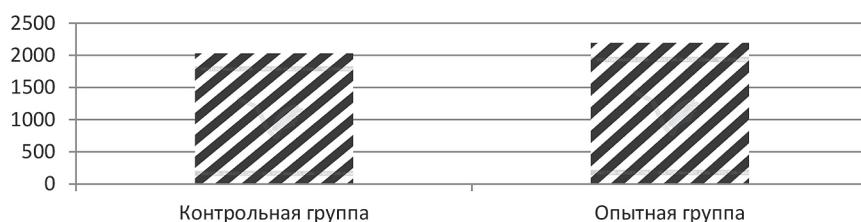


Рис. 1. Молочная продуктивность коров за период опыта (90 дней), л

По результатам биохимических исследований сыворотки крови в начале опыта установлено, что в фоновых показателях регистрировалось снижение общего белка, мочевины, глюкозы, триглицеридов и каротина. Был увеличен уровень трансамина в сравнении с референсными значениями.

В конце опыта у коров контрольной группы уровень общего белка был ниже по сравнению с животными, получавшими новую кормовую добавку на основе клиноптилолита, на 12,6%. Снижение уровня общего белка связано со снижением протеинсинтетической функции печени вызванное действием микотоксинов. Зарегистрирован невысокий уровень глюкозы, этот показатель у животных в опытных группах был в пределах референсных значений и составил разницу 3,3%. Снижение уровня глюкозы регистрируется под воздействием токсичных веществ, способствующих нарушению глюконеогенеза, что приводит к гипогликемии.

Использование новой комплексной кормовой добавки позволило обеспечить достоверное снижение ферментной активности АлАт на 24,4%, АсАт на 25,5% в сравнении с контрольными животными, у которых этот показатель регистрировался выше границ нормы. Применение комплексной кормовой добавки и адсорбентов оказало благоприятное влияние на липидный обмен, что выражается нормализации концентрации триглицеридов.

Обследование животных в конце опытного периода показало, что клинические признаки наблюдались только в контрольной группе и проявлялись в снижении аппетита, нерегулярной или отсутствие жвачки, тонуса рубца, признаки нарушения органов детоксикации и как следствие нарушение работы желудочно-кишечного тракта.

Внедрение разработанной кормовой добавки позволит снизить экономические потери и увеличить рентабельность отрасли молочного скотоводства.

Характеристика ксиланаз из штамма *Streptomyces spiralis* ВКМ Ас-1311

Ларионова А.П.¹, Трубицина Л.И.^{1,2}, Лисов А.В.^{1,2}, Леонтьевский А.А.^{1,2}

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
larian-n@yandex.ru

² Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38736

Ключевые слова: ксиланазы, деградация полисахаридов, гликозил-гидролазы, pH-оптимум, pH-стабильность, термостабильность, температурный оптимум.

Ксиланазы активно используются в сельском хозяйстве, пищевой и текстильной промышленности, где технологические процессы часто подразумевают термическую обработку целевого продукта, поэтому получение новых термостабильных ферментов (ксиланаз) для применения в различных биотехнологических процессах является актуальной задачей. В настоящее время поиск новых генов, кодирующих высокопотенциальные ферменты для биотехнологического применения, облегчен из-за большого количества секвенированных геномов различных микроорганизмов. *Streptomyces spiralis* – это грамположительная аэробная почвенная бактерия из семейства *Streptomycetaceae*, выделенная из почв Бразилии. Анализ полного генома этой бактерии выявил наличие нескольких генов, кодирующих ферменты, участвующие в деградации полисахаридов клеточных стенок растений (ксилан, целлюлоза).

В геноме бактерии *S. spiralis* ВКМ Ас-1311 обнаружены гены *ssx2* (WP_189908393.1) и *ssx3* (WP_189907301.1), кодирующие ферменты ксиланазы. Анализ их аминокислотных последовательностей показал наличие в составе белков каталитических доменов, принадлежащих 10 семейству GH10 гликозил-гидролаз.

С помощью ПЦР гены были амплифицированы, и затем клонированы в вектор pET-19mod без последовательности сигнального пептида. Проведена оптимизация условий экспрессии генов в *Escherichia coli*. Проведена очистка белков с помощью аффинной хроматографии до электрофоретически гомогенного состояния. Обнаружено, что ксиланазы обладали ферментативной активностью. Таким образом, были получены две активные ксиланазы SsX2 и SsX3 из штамма *S. spiralis* BKM Ac-1311, клонированные в вектор pET-19mod без последовательности сигнального пептида. Выход ксиланазы SsX2 составил – 3,3 мг/л, выход ксиланазы SsX3 – 7,9 мг/л. Удельная активность ксиланаз SsX2 и SsX3 составила 26,2 ед. и 53,5 ед. активности, соответственно. Оптимальная активность ферментов SsX2 и SsX3 в отношении ксилана наблюдалась при pH 6,0, при этом активность при pH ниже 3,0 отсутствовала. Ферменты были более стабильны при слабокислом (4,0 и 5,0) и нейтральном (6,0) значениях pH. Фермент SsX3 был менее термостабилен, чем SsX2. Время полуинактивации при 50 °C для ксиланазы SsX2 составляло более 60 минут, а для SsX3 – 60 минут. Фермент SsX3 инактивировался через несколько минут после инкубации при 60 °C, а время полуинактивации SsX2 при 60 °C составляло 10 минут. Температурный оптимум ксиланазы SsX2 составлял 70 °C, а ксиланазы SsX3 – 60 °C.

Таким образом, были исследованы физико-химические свойства полученных ксиланаз SsX2 и SsX3 из штамма *S. spiralis* BKM Ac-1311.

В дальнейшем планируется исследование осахаривания злаков и исследование влияния ингибиторов на активность ксиланаз SsX2 и SsX3, а также получение других липидических ферментов (ксиланаз и целлюлаз) из штамма *S. spiralis* для изучения их биотехнологического потенциала.

Конверсия холевой кислоты термофильными актинобактериями рода *Saccharopolyspora*

Лобастова Т.Г., 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.2023.17.38737

Ключевые слова: холевая кислота, термофильные актинобактерии, биоконверсия

Желчные кислоты – это большая группа стероидных соединений с 3α-гидроксильной группой, в большинстве случаев цис-А/Б-сочленением колец и C5–C9 углеродной боковой цепью при атоме C17. Эти соединения характеризуются низкой растворимостью в воде и амфильтальными свойствами. Большое количество желчных кислот поступает в окружающую среду с экскрементами теплокровных животных и человека. До настоящего времени деградация и биоконверсия желчных кислот изучалась у аэробных мезофильных бактериях (Olivera and Luengo, 2019) и анаэробных кишечных бактериях (Philipp, 2011). Сведения, касающиеся трансформации желчных кислот термофильными актинобактериями, ограничены несколькими публикациями. Так, показано, что умеренно-термофильные штаммы *Saccharopolyspora rectivirgula* BKM Ac-810 и *Saccharopolyspora hirsuta* BKM Ac-666 способны к конверсии литохолевой кислоты (Kollerov et al., 2013). Штамм *S. rectivirgula* BKM Ac-810 модифицировал дезоксихолевую кислоту с образованием урсохолевой кислоты (Deshcherevskaya et al., 2016).

Актуальной задачей является изучение биоконверсии холевой кислоты (ХК) умеренно-термофильными актинобактериями рода *Saccharopolyspora*: *S. hirsuta* BKM Ac-666 *S. rectivirgula* BKM Ac-642, *S. rectivirgula* BKM Ac-810, *Saccharopolyspora* sp. BKM Ac-2789 и *Saccharopolyspora* sp. BKM Ac-2790 в богатой питательной среде.

Конверсию ХК (0,5 г/л) штаммами рода *Saccharopolyspora* проводили, как описано ранее (Lobastova et al., 2021) при температуре 45 °C. Субстрат вносили в виде горячего этанольного раствора. Анализ холе-

вой кислоты и ее производных проводили методом ТСХ согласно ранее описанной методике (Lobastova et al., 2021).

Наиболее эффективно трансформировал XK штамм *S. hirsuta* BKM Ac-666 (табл. 1). Среди продуктов трансформации XK этим штаммом детектировали 7 α ,12 α -дигидрокси-3-оксо-5 β -холан-24-овую кислоту (3-кето-XK, ~15%), 3 α ,12 α -дигидрокси-7-оксо-5 β -холан-24-овую кислоту (7-кето-XK, ~11%), 12 α -гидрокси-3,7-диоксо-5 β -холан-24-овую кислоту (3,7-дикето-XK, ~10%) (рис. 1). Другие штаммы рода *Saccharopolyspora* слабо трансформировали XK, а убыль субстрата не превышала 9% (табл. 1). 3-Кето-XK была основным продуктом конверсии XK этими штаммами, выход составил 2–6.1%. (рис. 1).

Таблица 1

Содержание остаточной XK при ее трансформации умеренно-термофильными актинобактериями рода *Saccharopolyspora*

Штамм	XK (0.5 г/л), 12 суток биоконверсии, % (вес.)
<i>S. hirsuta</i> BKM Ac-666	47-50%
<i>S. rectivirgula</i> BKM Ac-642	95-97%
<i>S. rectivirgula</i> BKM Ac-810	95-96.8%
<i>Saccharopolyspora</i> sp. BKM Ac-2789	93-95%
<i>Saccharopolyspora</i> sp. BKM Ac-2790	91-92.6%

Ранее было показано, что в геномной последовательности штамма *S. hirsuta* BKM Ac-666 присутствуют кандидатные гены, кодирующие ферменты пути деградации холата (Lobastova et al., 2021). Среди них был обнаружен ген *3 α -hsd*, кодирующий 3 α -гидрокистероиддегидрогеназу, который ответственен за окисление 3 α -ОН в 3-кето группу. Продуктом реакции трансформации XK 3 α -гидрокистероиддегидрогеназой *S. hirsuta* BKM Ac-666 является 3-кето-XK. Другие штаммы рода *Saccharopolyspora* также проявляют 3 α -гидрокистероиддегидрогеназную активность. При этом наблюдается накопление продукта – 3-кето-XK в среде трансформации (рис. 1). В отличие от других штаммов, *S. hirsuta* BKM Ac-666 проявляет также

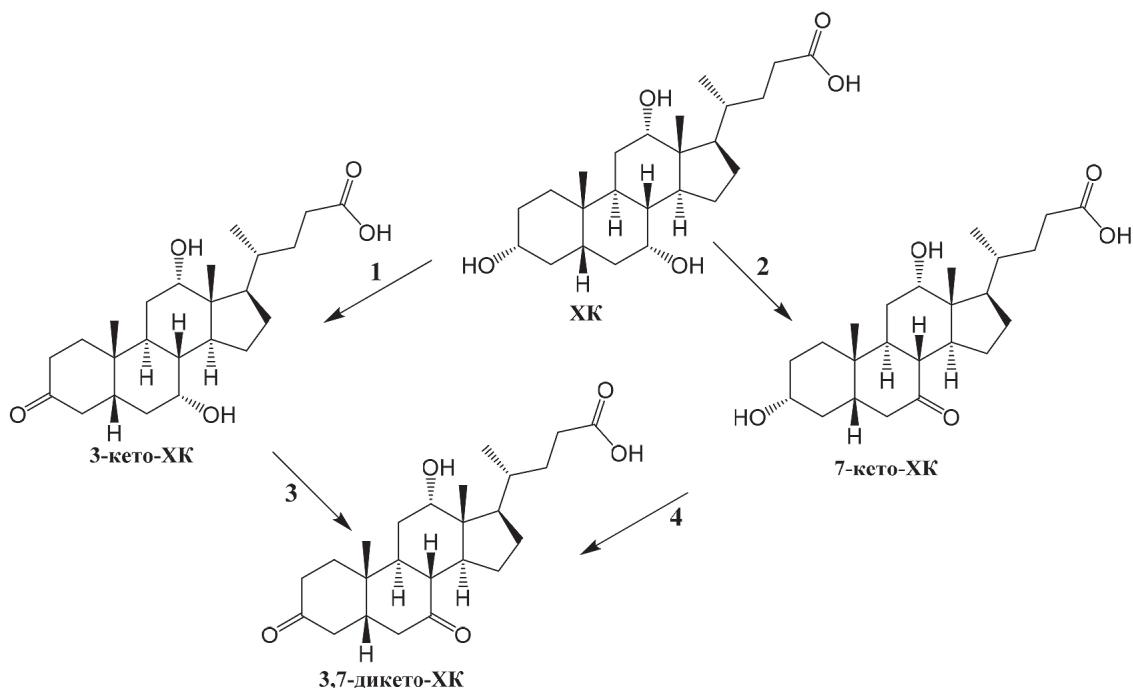


Рис. 1. Продукты трансформации XK умеренно-термофильными актинобактериями: 1 – *S. hirsuta* BKM Ac-666, *S. rectivirgula* BKM Ac-642, *S. rectivirgula* BKM Ac-810, *Saccharopolyspora* sp. BKM Ac-2789, *Saccharopolyspora* sp. BKM Ac-2790; 2, 3, 4 – *S. hirsuta* BKM Ac-666

7α-гидроксистероиддегидрогеназную активность, т.е. окисляет *7α*-ОН в *7*-кето группу с образованием *7*-кето-ХК. Этот штамм способен осуществлять последовательное окисление гидроксигрупп в положения *3*α и *7*α с образованием *3,7*-дикето-ХК.

Таким образом, умеренно-термофильные штаммы рода *Saccharopolyspora* способны трансформировать ХК до *3*-кето-ХК. Выявлены преимущества *S. hirsuta* BKM Ac-666 как биокатализатора деградации холатов.

Результаты расширяют представления о каталитической активности термофильных актинобактерий в отношении желчных кислот.

Работа поддержанна Российской научным фондом (Проект 21-64-00024).

Литература

1. Olivera E.R., Luengo J.M. Genes, 2019, 10:512. DOI:10.3390/genes10070512
2. Philipp B. Appl. Microbiol.Biotecnol., 2011, 89 (4), S903-915.
3. Kollerov V.V., Monti D., Deschcherevskaya N.O. et al. 2013. Steroids, 78:370–378. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.12.010
4. Deschcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Kollerov V.V., Kazantsev A.V., Donova M.V. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatyc, 2016, V. 133, S157-S165
5. Lobastova T., Fokina V., Tarlachkov S., Shutov A., Bragin Eu., Kazantsev A., Donova M. Microorganisms, 2021, 9, 2554. DOI:10.3390/microorganisms9122554.

Получение биологически активных соединений на основе (–)-изопулегола с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362

Мальцева П.Ю.^{1,2}, Лучникова Н.А.^{1,2}, Ильина И.В.³, Ившина И.Б.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.³

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН

²Пермский государственный национальный исследовательский университет

³Новосибирский институт органической химии имени академика Н.Н. Ворожцова СО РАН
inbox.98@bk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38738

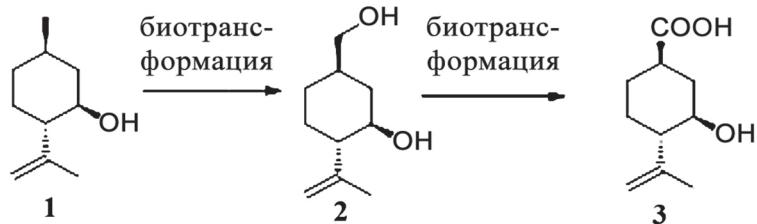
Ключевые слова: *Rhodococcus rhodochrous*, биотрансформация, (–)-изопулегол, биологически активные соединения.

(–)-Изопулегол ($C_{10}H_{18}O$, CAS 89-79-2) – монотерпеновый спирт, который активно используется в качестве исходного соединения для получения биологически активных веществ ввиду его низкой себестоимости и широкой доступности [1–3]. В отличие от химических методов, биокатализ открывает возможность получения целевых продуктов при обычных температурах и давлении, в неагрессивной реакции среды и экологически безопасных условиях. При этом стоит отметить явный недостаток исследований, посвященных трансформации (–)-изопулегола с использованием микроорганизмов. Не так давно были предприняты единичные попытки трансформации (–)-изопулегола иммобилизованными ферментами, выделенными из мицелиальных грибов [4]. В настоящий момент одной из успешно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные актиномицеты рода *Rhodococcus*, способные катализировать широкий спектр стерео- и региоселективных реакций [5].

Цель настоящей работы – оценка способности родококков к трансформации (–)-изопулегола с целью получения биологически активных соединений.

На основе биоресурсов Региональной профильтрованной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, УНУ 73559, ЦКП 480868, <http://www.iegmcoll.ru>) отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, проявляющий

Рис. 1. Схема биоконверсии (–)-изопулегола с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362



высокую устойчивость к (–)-изопулеголу (1) и катализирующий его эффективную конверсию с образованием двух новых 10-гидрокси (2) и 10-карбокси (3) производных (рис. 1).

По результатам проведенного *in silico*-анализа, полученные производные обладают меньшей степенью гидрофобности и экотоксичности по сравнению с исходным терпеноидом. Анализ прогнозируемой биоактивности полученных метаболитов на основе структурных формул показал, что оба соединения (2, 3) могут обладать противоопухолевой активностью и использоваться в качестве потенциальных респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы (табл. 1).

Таблица 1

Предполагаемая биологическая активность (–)-изопулегола и его производных

Предполагаемая активность	(-)-Изопулегол		10-Гидрокси-(–)-изопулегол		10-Карбокси-(–)-изопулегол	
	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i
Ингибитор бета-глюкуронидазы	–	–	0,670	0,005	0,714	0,004
Респираторный аналептик	–	–	0,568	0,026	0,686	0,016
Противоопухолевая	–	–	0,550	0,057	0,482	0,002

В результате биоинформационического анализа результатов NGS-секвенирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 и последующей постановки ПЦР в реальном времени выявлены гены, ответственные за образование ферментов семейства CYP450, участвующих в процессе биоконверсии (–)-изопулегола. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения транскриптомов штамма-биотрансформатора с целью определения участвующих в процессе конверсии (–)-изопулегола ферментов и кодирующих их функциональных генов.

Полученные данные расширяют представление о биокаталитическом потенциале актиномицетов рода *Rhodococcus* и перспективах их использования в качестве эффективных катализаторов процессов биотрансформации для получения биологически активных соединений на основе растительных моно-терпеноидов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (АААА-А19-119112290008-4, Соглашение 075-15-2021-1051) с использованием оборудования ЦКП «Региональная профильтрованная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и веществ» Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

Литература

1. Ilyina I.V. et al. Highly Potent Activity of Isopulegol-Derived Substituted Octahydro-2H-Chromen-4-Ols against Influenza A and B Viruses // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. V. 28. N. 11. P. 2061–2067.
2. Le T.M. et al. Synthesis and Transformation of (–)-Isopulegol-Based Chiral β-Aminolactones and β-Aminoamides // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. N. 11. P. 1–19.
3. Le T.M., Szakonyi Z. Enantiomeric Isopulegol as the Chiral Pool in the Total Synthesis of Bioactive Agents // Chem. Rec. 2022. V. 22. N. 1. P. 1–32.
4. Su A. et al. Cutinases as Stereoselective Catalysts: Specific Activity and Enantioselectivity of Cutinases and Lipases for Menthol and Its Analogs // Enzyme Microb. Technol. 2020. V. 133. P. 1–8.
5. Ivshina I.B. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko // In Microbial Resources; ed. by I. Kurtboke. Elsevier, 2017. P. 121–148.

Изучение продукции фенолоксидазных ферментов гриба *Fomes fomentarius* ВКПМ F-1531 методом твердофазного культивирования на лигноцеллюлозных субстратах

Матусевич С.В., Аминева Д.М., Гильмутдинова Э.Р., Халимова А.Х.

ФГБОУ ВО Уфимский государственный нефтяной технический университет

kiselevabtmp@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38739

Ключевые слова: базидиомицет, лакказа, ТФК.

С целью получения препаратов фенолоксидазных ферментов в условиях твердофазного культивирования гриба *Fomes fomentarius* ВКПМ F-1531 [1] использовали различные среды на основе лигноцеллюлозных материалов (опилки/стружки древесины лиственных пород деревьев, солома) в сочетании с другими зерновыми сельскохозяйственными культурами (овес, хлопья овсяные, пшеница) и отходами овощей и фруктов в виде кожуры/жома (шрота, жмыха и кожуры семян подсолнечника, кожуры тыквы, банана, жом свеклы), которые после измельчения увлажняли до 68–70%-ной влажности. Соотношения компонентов среды ТФК, содержащей опилки/стружку (субстрат 1):субстрат № 2 (зерновые):субстрат № 3 (отходы), варьировали в интервале 1:1:(0–6).

Оптимальным посевным материалом служила 7–9-суточная глубинная культура гриба, вносимая асептически в виде суспензии с оптической плотностью 1,9–2,1 опт.ед/мл. Инкубирование грибного инокулята в вариантах сред ТФК осуществляли в режимах ступенчатого терmostатирования при температуре 30 °C в течение 3–5 сут и далее при температуре 25–26 °C в темноте и поддержания заданной влажности.

В процессе роста гриба получали микоматы различной плотности, вес которых оценивали после высушивания при комнатной температуре. После 20–24-часовой экстракции водно-солевым раствором (гидромодуль 1:(4–4,5) при температуре 4 °C и отделения биомассы фильтрацией/фугованием оценку общей лакказной (фенолоксидазной) активности полученных экстрактов проводили по скорости окисления пирокатахина (10 mM) [2].

Визуальную оценку роста гриба проводили по площади и плотности обрастаия лигноцеллюлозного сырья, синтеза лакказы – по степени осветления лигноцеллюлозы в течение 24 сут. Высокие показатели скорости роста и биомассы были получены на средах с сочетанием древесных опилок и стружек с овсяными хлопьями и кожурой тыквы, банана, жома свеклы и подсолнечника.

Изучения динамики лакказной активности экстрактов поверхности культуры гриба *F. fomentarius* F-1531 обнаруживали максимальную активность препаратов для 16-ти суточных микоматов (до 180 ед/г ACB). В результате наиболее эффективные препараты фенолоксидазных ферментов поверхности культуры гриба *F. fomentarius* F-1531 были получены при выращивании гриба на твердо-сыпучей среде, состоящей

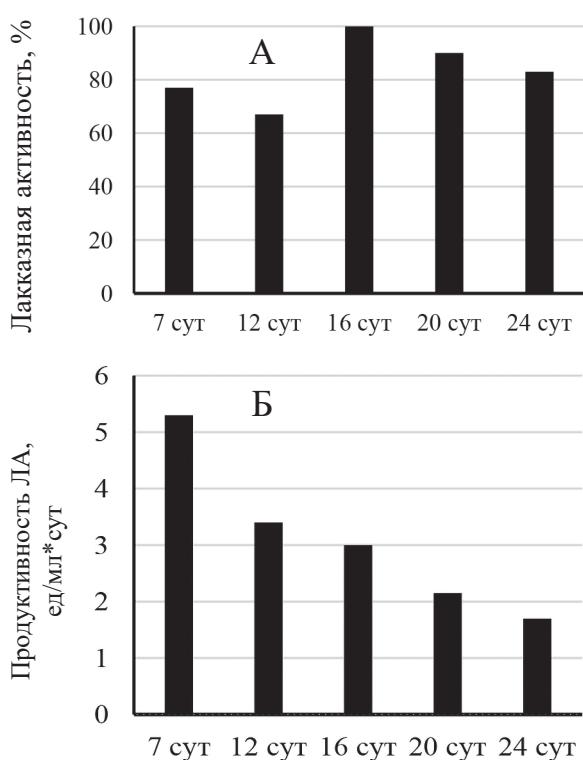


Рис. Продукция оксидазных ферментов гриба *F. fomentarius* F-1531 по активности (А) и скорости синтеза (Б) в процессе ТФК

из увлажненных опилок, овсяных хлопьев крупного помола и подсолнечного жмыха в соотношении 1:1:1,5. Однако анализ данных продуктивности ферментных препаратов экстрактов указывают на то, что продуктивность 7-ми суточного препарата превышает на 40% показатели 16-ти суточных препаратов и может быть эффективно получен за более короткий период. При этом его активность может составлять до 90 ед/г АСВ или продуктивностью до 5,3 ед/мл·сут.

Полученные препараты ЭПК в период 7–16-суточного ТФК помимо повышенной лакказной активности (по пирокатехину и ABTS), обладали целлюлазной активностью, обнаруживали марганец-, лигнин- и общую пероксидазную активность (по о-дианизидину); эффективно окисляли (обесцвечивали) широкий ряд синтетических красителей, в числе которых наиболее устойчивые и токсичные, как ремазол, малахитовый зеленый, метиловый оранжевый и др. ксенобиотики [2, 3].

Препараты с повышенными значениями фенолоксидазных ферментов также можно получать в условиях ТФК гриба на стружках/опилках в сочетании с овсяными хлопьями и с жомом свеклы, банановых корок и кожуры тыквы в течение 7–16 сут.

Таким образом, в процессах твердофазного культивирования гриба *F. fomentarius F-1531* на оптимизированной лигноцеллюлозной среде из измельченных отходов деревообработки и сельскохозяйственных (опилок, овса хлопьев: жмыха подсолнечника) в соотношении 1:1:1,5 могут быть получены высокоактивные препараты лакказы (до 180 ед/г АСВ) при использовании для деструкции ароматических ксенобиотиков, в т.ч. обесцвечивании токсичных синтетических красителей в составе сточных вод.

Литература

1. Киселева С.В., Халимова Л.Х., Петухова Н.И., Зорин В.В. Штамм *Fomes fomentarius* ВКПМ F-1531 – продуцент фенолоксидазных ферментов. Патент РФ № RU 2770690 С1 от 21.04.2022 г.
2. Биссангер Х. Практическая энзимология. – М: Бином. – 2011. – 328 с.
3. Киселева С.В. Оптимизация условий синтеза и оценка деструктивного потенциала лакказы гриба *Fomes fomentarius* ВКПМ F-1531 / Киселева, С.В., Насибуллина, Э.Р., Аминева, Д.М., Гарифуллина, А.Д., Руднева, Н.Н., Халимова, Л.Х. // Башкир. хим. ж., 2023, т. 30, №2 – с. 31–39.

Применение модели sn-1,2,3-статистического распределения ацилов жирных кислот в запасных триацилглицеринах микроводорослей из рода *Vischeria* (штаммов H-242 и C-70 коллекции IPPAS) для оценки их биотехнологического потенциала

Сидоров Р.А., Казаков Г.В., Стариков А.Ю., Синетова М.А.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
roman.sidorov@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38740

Ключевые слова: микроводоросли, нейтральные липиды, полиненасыщенные жирные кислоты, структурированные триацилглицерины

Микроводоросли-продуценты полиненасыщенных (ПНЖК) ω-3 жирных кислот (ЖК) давно привлекают внимание исследователей, так как эти ЖК играют важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы теплокровных, в том числе – человека (Khuzin-Goldberg et al., 2011). Например, эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, 20:5ω3) уже много лет рекомендуется как добавка в составе терапии и профилактики атеросклероза и тромбозов у человека (Liao et al., 2022). Положение жирной кислоты в молекуле три-ацилглицерина (ТАГ) влияет на его нутрицевтические свойства, окислительную стабиль-

ность, скорость адсорбции в желудочно-кишечном тракте, метаболизм и даже на атеро-генез (Mu and Porsgaard, 2005). Известно, что ЖК, ацилирующие *sn*-1 и *sn*-3 положения атомов углерода глицеринового остатка, лучше гидролизуются панкреатической липазой, а кислоты в *sn*-2-положении усваиваются в формеmonoацилглицеринов; так, дети лучше усваивают пальмитиновую кислоту из *sn*-2-положения ТАГ жира материнского молока, чем из *sn*-1 или *sn*-3 положений ТАГ растительных масел (Quinlan and Moore, 1993). Показано, что лучшие нутрицевтические свойства проявляют ТАГ, содержащие в их *sn*-2-положении ПНЖК – арахидоновую или ЭПК – такие ТАГ лучше абсорбируются, чем ТАГ с таким же ЖК составом, но в которых эти ЖК распределены случайным образом между *sn*-положениями углеродных атомов глицеринового остатка (Takeuci et al., 2002). В этой связи особый интерес представляют так называемые структурированные ТАГ (сТАГ), содержащие в их *sn*-2-положении ПНЖК или пальмитиновую кислоту – такие ТАГ обладают множеством ценных нутрицевтических свойств. Потенциальным источником таких сТАГ могут стать микроводоросли рода *Vischeria*, которые известны исследователям как суперпродуценты ЭПК (Sinetova et al., 2021).

Мы изучили жирнокислотный состав суммарных липидов (СЛ), запасных ТАГ и осо-бенности распределения ЖК между *sn*-положениями остатка глицерина в них у клеток двух штаммов микроводорослей из рода *Vischeria* – IPPAS H-242 и C-70, культивируемых на среде ВВМ. Обнаружено более 20 индивидуальных ЖК, главными из которых были 16:0, 16:1, 18:1 и 20:5 – на их долю приходилось более 80% от суммы ЖК. Результаты ГХ-МС анализов представлены в табл. 1. Можно видеть, что в СЛ обоих штаммов содержалось высокое количество ЭПК – до 22,4% у клеток штамма C-70, однако она практически не запасалась в ТАГ – там её содержание было в 2–3,5 раза ниже, чем в СЛ. В ТАГ она ацилировала главным образом *sn*-1 и *sn*-3-положения, где её концентрация была в 3,6–9,4 раза выше, чем в *sn*-2-положениях, в то время, как пальмитиновая кислота была практически полностью сосредоточена в *sn*-2-положении ТАГ обоих исследованных штаммов. В связи с этим наблюдением представляло интерес рассчитать позиционно-видовой состав ТАГ этих микроводорослей, так как они могут содержать высокие количества сТАГ.

Таблица 1

**Жирнокислотный состав суммарных липидов, триацилглицеринов
и их *sn*-2, *sn*-1,3-положений у микроводорослей
рода *Vischeria* (штаммы IPPAS H-242 и C-70)**

Жирные кислоты, мол.%		14:0 M	16:0 P	16:1 ω9 Po	18:0 S	18:1 ω9 O	18:2 ω6 L	18:3 ω3 Ln	20:4 ω6 A	20:5 ω3 E	Минорные ЖК*
H-242	СЛ	3,3	18,3	43,3	0,7	3,6	2,0	0,6	3,0	22,4	2,8
	ТАГ	<i>sn</i> -1,2,3	1,5	22,2	48,3	2,1	9,3	4,8	1,9	1,2	6,4
	ТАГ	<i>sn</i> -2	2,5	57,6	28,8	1,9	2,6	2,3	0,8	0,2	2,3
	ТАГ	<i>sn</i> -1,3**	1,0	4,5	58,1	2,3	12,6	6,0	2,4	1,7	8,4
C-70	СЛ	2,9	23,0	36,9	0,8	8,7	3,9	0,5	5,2	14,4	3,7
	ТАГ	<i>sn</i> -1,2,3	1,8	21,0	54,0	0,6	9,2	1,9	0,2	1,6	7,7
	ТАГ	<i>sn</i> -2	2,5	59,9	22,9	2,9	3,7	4,2	1,3	0,2	1,4
	ТАГ	<i>sn</i> -1,3**	1,5	1,6	69,0	0,0	11,8	0,8	0,0	2,3	10,8

* Содержали 0,05–0,5% 12:0, 14:1ω9, 16:1ω5, 16:1ω7, 16:2ω9, 18:3ω6, 18:4ω6, 20:0, 20:3ω6, 22:0, 20:4ω3, 24:0.

** Вычислены по формуле $[S]_{1,3} = (3 \cdot [S]_{1,2,3} - [S]_2) / 2$.

Определение позиционно-видового состава (ПВС) ТАГ, несмотря на развитие современной техники, до сих пор является трудной задачей ввиду большого разнообразия ТАГ – так, для ТАГ клеток H-242, содержащих 21 ЖК, количество молекулярных видов может достигать 9261. Для характеристики ПВС ТАГ изучаемых объектов мы применили разработанную нами программу UTCA (Ultimate Triacylglycerols Calculation Application), выполняющую расчет состава ТАГ на основании их ЖК-состава (*sn*-1,2,3-положений) и ЖК состава *sn*-2-положения, которое определяется как ЖК-состав *sn*-2-моноацилглицеринов,

получаемых в результате липазного гидролиза ТАГ. Расчеты выполняются на основе хорошо зарекомендовавшей себя модели *sn*-1-статистического-2-статистического-3-статистического распределения ЖК между *sn*-положениями углеродных атомов остатка глицерина.

Результаты вычислений отражены в табл. 2, в которой приведены молекулярные виды ТАГ с массовой долей более 1% от суммы ТАГ. Можно видеть, что в клетках IPPAS H-242 и C-70 на сумму 14 молекулярных видов приходится 66,6 и 77,4% ТАГ соответственно, 7 видов из них относятся к USU типу, где U и S – ацилы ненасыщенных и насыщенных ЖК соответственно.

Таблица 2

Позиционно-видовой состав ТАГ клеток микроводорослей рода *Vischeria*, штаммы IPPAS H-242 и C-70

Тип ТАГ	Виды ТАГ, мол.%	H-242	C-70
UUU	<i>sn</i> -PoPoPo	9,7	10,9
	<i>sn</i> -PoPoO	4,2	3,7
	<i>sn</i> -PoPoE	2,8	3,4
	<i>sn</i> -PoPoL	2,0	–
	<i>sn</i> -PoLPo	–	2,0
	<i>sn</i> -PoOPo	–	1,8
USU	<i>sn</i> -PoPPo	19,4	28,5
	<i>sn</i> -PoPO	8,5	9,7
	<i>sn</i> -PoPA	1,2	1,9
	<i>sn</i> -PoPE	5,6	8,9
	<i>sn</i> -PoPL	4,0	–
	<i>sn</i> -OPE	1,6	1,5
	<i>sn</i> -PoSPo	–	1,4
	<i>sn</i> -PoMPo	–	1,2
	<i>sn</i> -PoPLn	1,6	–
SSU	<i>sn</i> -PPPo	3,0	1,3
	<i>sn</i> -SPPo	1,5	–
	<i>sn</i> -MPPo	–	1,2
SUU	<i>sn</i> -PPoPo	1,5	–

Несмотря на высокое сходство позиционно-видового состава ТАГ, клетки штамма IPPAS C-70 запасали в 1,5 раза больше *sn*-1-пальмитолеил-2-пальмитоил-3-пальмитолеилглицерина, чем клетки IPPAS H-242, а суммарное содержание стАГ в нём достигало 39,4% от суммы ТАГ, в то время как в клетках штамма IPPAS H-242 их количество составляло 29,5%.

Таким образом, изученные штаммы могут рассматриваться как естественный источник структурированных ТАГ, содержащих в *sn*-2-положении пальмитиновую кислоту, а в *sn*-1 и *sn*-3 – пальмитолеиновую. Известно, что пальмитолеиновая кислота участвует в формировании и поддержании функционирования кардиомиоцитов в условиях интенсивных физических нагрузок и способствует предотвращению развитию гипертрофической кардиомиопатии (*Foryst-Ludwig and Kriessl, 2015*).

Применение рекомбинантных штаммов *Mycobacterium neoaurum* в одностадийной трансформации фитостерина в тестостерон

Текучева Д.Н., Карпов М.В., Фокина В.В., Тимакова Т.И., Шутов А.А., Донова М.В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
tekuchevadn@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38741

Ключевые слова: тестостерон, миколицибактерии, фитостерин, гетерологичная экспрессия, биотрансформация стероидов, 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа, 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназа.

Тестостерон (ТС) – андрогенный стероидный гормон, регулирующий рост скелета, повышающий плотность костей и количество мышечной массы, усиливающий обмен микро- и макроэлементов. ТС востребован и широко используется в медицине, а также является предшественником для других стероидных соединений.

Тестостерон в настоящее время синтезируют химическим путем в 4 стадии из биотехнологически полученных андрост-4-ен-3,17-диона (АД) или андрост-1,4-диен-3,17-диона (АДД). Однако существуют быстрорастущие непатогенные актинобактерии рода *Mycolicibacterium* (*M. smegmatis*, *M. fortuitum* и *M. neoaurum*) способные окислять боковую цепь стеринов, а также трансформировать стероидное ядро (Donova, 2023). Наличие в клеточной стенке миколовых кислот является крайне важным для активного транспорта и биодоступности стеринов для клеток. Разрабатываются подходы микробиологического получения ТС из растительных стеринов, но при низкой нагрузке субстратов – до 5,0 г/л.

3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназа (КстД) катализирует депротонирование C1(α) и C2(β) в кольце А и является ключевыми в превращении АД в АДД. Искусственным генетическим нокаутом гена *kstD* был создан штамм *M. neoaurum* NRRL B-3805 $\Delta kstD$ (Lorraine, Smith, 2017). Делеция гена *kstD* должна приводить к накоплению в основном АД в ходе окисления алифатической цепи фитостерина. Однонуклеотидная замена в гене *kstD*, определяет преимущественное накопление АД штаммом *M. neoaurum* Ac-1815D и, напротив, АДД штаммом Ac-1816D (Tekucheva et al., 2022).

Целью настоящей работы являлась разработка эффективного одностадийного способа получения

ТС из фитостерина (ФС, 5 – 20 г/л) с использованием рекомбинантных штаммов *M. neoaurum*, ко-экспрессирующих гены 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД) гриба *Cochliobolus lunatus* и глюказо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФД) *Mycobacterium tuberculosis*.

Сконструированная плазмида pMVN25 (рис. 1) позволила осуществить совместную конститутивную экспрессию синтетических генов, кодирующих 17 β -ГСД и Г6ФД. Созданные рекомбинанты *M. neoaurum* BKM Ac-1816D (pMV261N) (1816 N25), BKM Ac-1815D (pMV261N) (1815 N25), NRRL B-3805 $\Delta kstD$ (pMV261N) (B-3805D N25) не отличались от родительских штаммов по скорости роста в жидкой среде (не приведено).

При проведении процесса в режиме активной аэрации (окислительный этап) доминантным продуктом у штаммов *M. neoaurum* BKM Ac-1816D и 1816 N25 был АДД, его концентрация достигала 65 и 58% (мол.) соответственно. Более низкое накопление АДД при использовании 1816 N25 связано с одновременным восстановлением АДД до дТ уже на этом

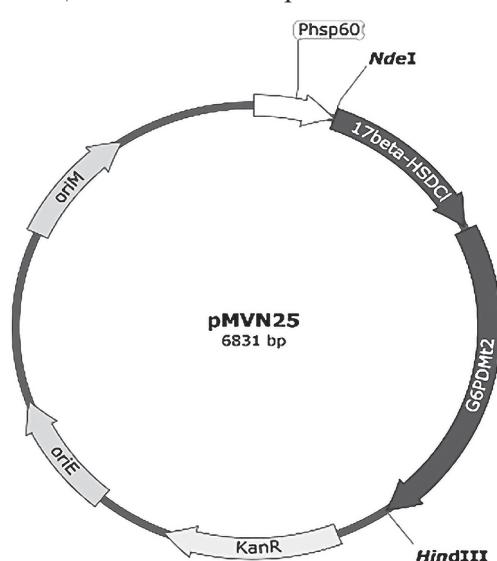


Рис. 1. Структура рекомбинантной плазмида pMVN25

этапе. При снижении уровня аэрации (восстановительный режим) наблюдалось активное накопление ТС у родительского (Ac-1816D), и равного количества Т и дТ у рекомбинантного (1816 N25) штаммов.

У штаммов *M. neoaurum* BKM Ac-1815D и NRRL B-3805 $\Delta kstD$ основным промежуточном продуктом окисления фитостерина являлся АД. У родительских штаммов его выход в конце окислительного этапа был выше, чем у соответствующих рекомбинантных штаммов, для которых уже на этом этапе наблюдалось накопление ТС, что свидетельствует о повышенной 17-оксостероид-редуктазной активности рекомбинанта. Достигнутые с помощью штаммов 1815 N25 и B-3805D N25 выходы и титры Т составили 47,7 и 49,5% (мол.) и 1,6–1,7 г/л соответственно.

Фитостерин утилизировался практически полностью при исходной концентрации 5 г/л (95–99%) и на 75–82% при нагрузке 20 г/л, что говорит о снижении степени биоконверсии фитостерина при увеличении его начальной концентрации у всех изучаемых штаммов. Однако, достигаемые титры ТС при биоконверсии 20 г/л фитостерина превышали полученные при внесении фитостерина в концентрации 5 г/л и составили 3,7, 4,1 и 4,4 г/л при использовании штаммов 1816 N25, Ac-1815D и B-3805 $\Delta kstD$ соответственно.

Синтетические гены, кодирующие 17 β -ГСД из *Cochliobolus lunatus* (17beta-HSDCl) и бактериальную Г6ФДГ 2 типа из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (G6PDMt2), были клонированы в векторе pMV261N под контролем конститутивного промотора *Phsp60*. Плазмида содержит кассету устойчивости к канамицину (KanR) и точки начала репликации в клетках *E.coli* (oriE) и микобактериях (oriM).

Таким образом, введение в лабораторные штаммы *M. neoaurum* NRRL B-3805 $\Delta kstD$, Ac-1815D и Ac-1816D бицистронной генетической конструкции с гетерологичными генами 17 β -ГСД и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, регулируемыми конститутивным промотором, способствует повышению выхода 17 β -восстановленных продуктов (ТС и дегидротестостерона).

Полученные данные расширяют знания о физиологии стероидного метаболизма и открывают перспективы селективного синтеза тестостерона из природных растительных стеринов в одностадийном биотехнологическом процессе при высоких нагрузках субстрата.

Литература

1. *Donova M.V.* Current Trends and Perspectives in Microbial Bioconversions of Steroids. // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. *Barreiro C., Barredo J.L.*: New York: Humana Press., 2023. V. 2704.
2. *Lorraine J.K., Smith M.C.M.* Genetic Techniques for Manipulation of the Phytosterol Biotransformation Strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805. In Microbial Steroids // Methods in Molecular Biology / Eds. *Barredo J.L., Herráiz I.*: New York, NY: Springer New York, 2017. V. 1645.
3. *Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.V., Donova M.V.* Bioproduction of Testosterone from Phytosterol by *Mycolicibacterium neoaurum* Strains: “One-Pot”, Two Modes. *Bioresour. Bioprocess.* 2022. V. 9. P. 116.

Биотехнологический потенциал штаммов *Penicillium* для утилизации отходов производства пальмового масла

Топилина Ю.С.^{1,2}, Мостовая А.К.¹, Паталаха А.Е.¹, Иvasенко Д.А.^{1,2}, Герасимчук А.Л.¹

¹ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

²ООО «Дарвин», Томск

madam.topilina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38742

Ключевые слова: отходы производства пальмового масла, биомасса масличной пальмы, липолитическая активность, деструкция отходов, биотехнология микроорганизмов, биоконверсия, *Penicillium chrysogenum*, *P. goetzei*.

Увеличивающееся с каждым годом производство пальмового масла, которое широко используется в пищевой и перерабатывающей промышленности во всём мире, связано с образованием большого количества отходов, наносящих огромный ущерб окружающей среде [1]. Использование аборигенных микроорганизмов, выделенных локально из разных типов отходов производства пальмового масла, может быть эффективным инструментом для их биоремедиации вследствие метаболических особенностей микроорганизмов [2]. Ранее из твердых отходов производства пальмового масла, представленных отработанной и складированной биомассой масличной пальмы (содержащей 60% масла) нами выделены штаммы *Penicillium chrysogenum* и *P. goetpii*, обладающие липополитической активностью и являющимися возможными кандидатами для биодеструкции данного типа отходов.

Цель исследования – изучить возможность деструкции отходов производства пальмового масла с помощью штаммов *Penicillium chrysogenum* и *P. goetpii*.

Для этого в лабораторных условиях проведен эксперимент по биодеструкции модельных отходов биомассы штаммами *P. chrysogenum* sp. ZCMC-02M и *P. goetpii* sp. ZCMC-01M. В качестве модельных отходов использовали смесь кокосового волокна с пальмовым маслом. К брикету кокосового субстрата весом 0,5 кг предварительно добавляли 1 л дистиллированной воды для набухания. Полученную набухшую массу перемешивали с пальмовым маслом в соотношении 1:1. Полученную смесь автоклавировали и затем в условиях ламинарного бокса фасовали в стерильные пластиковые ёмкости объемом 0,5 л. Крышки ёмкостей содержали отверстия, заткнутые стерильной ватой, для вентиляции и доступа кислорода. Затем проводили инокуляцию смеси жидкой культурой штаммов. Для получения инокулята каждый штамм культивировали в 500 мл жидкой среды Чапека-Докса на протяжении 9 суток. Липополитическая активность в жидкой среде, измеренная методом Ота-Ямада [3] составляла не менее 3,5 мкмоль/ч·мл для штамма ZCMC-01M и не менее 2,5 мкмоль/ч·мл для штамма ZCMC-02M. Инокуляцию смеси субстрата проводили 50 мл культуральной жидкости. Для каждого из штаммов эксперимент проводился в 4 повторностях. В контрольные ёмкости помещали только смесь кокосового волокна и пальмового масла без добавления инокулята. Инкубирование всех экспериментальных и контрольных ёмкостей со смесью субстрата, инокулированной штаммами *P. chrysogenum* sp. ZCMC-02M и *P. goetpii* sp. ZCMC-01M проводили при температуре 22 °С на протяжении 30 суток.

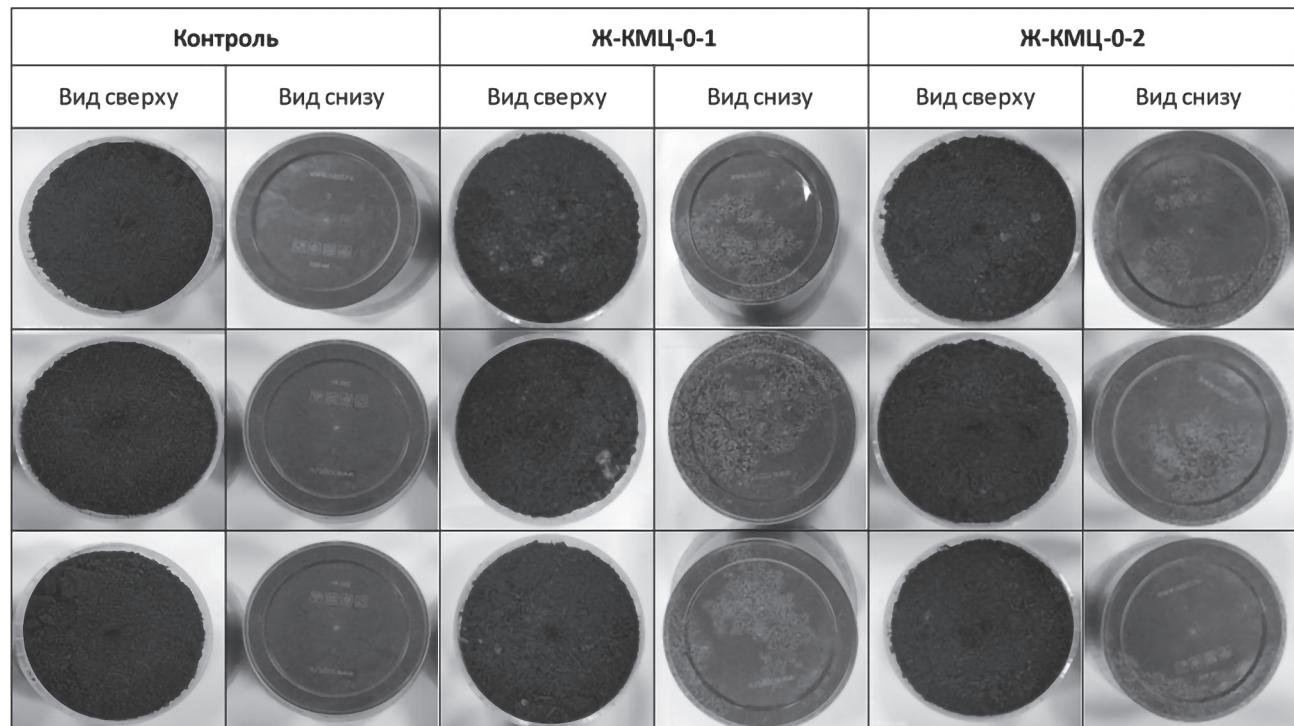


Рис. 1. Обрастание смеси из кокосового субстрата и пальмового масла микромицетами в процессе инкубирования при температуре 22 °С через 30 суток культивирования. На фото изображен вид сверху при открытой крышке и вид снизу с обрастаниями

После завершения эксперимента была произведена визуальная оценка результатов инкубирования модельной смеси отходов производства пальмового масла с добавлением штаммов микромицетов (рис. 1). В контрольных ёмкостях не обнаружено обрастаий биомассы, присутствовал запах кокосового субстрата. В ёмкостях со штаммами обрастания смеси субстрата в разной степени наблюдали по всем поверхностям субстрата, включая верхнюю, нижнюю и боковые. В эксперименте с добавлением штамма *P. goetpii* sp. ZCMC-01M степень обрастания кокосового субстрата с пальмовым маслом составила 40–70%, в ёмкостях присутствовал запах кокосового субстрата и слабый запах масла, также отмечено спороношение. Штамм *P. chrysogenum* sp. ZCMC-02M показал обрастане субстрата на 20–40%, в ёмкостях присутствовал только запах кокосового субстрата, запах масла отсутствовал, также отмечены признаки спороношения.

Оценить степень утилизации пальмового масла в данном эксперименте позволит определение содержание масла в контрольных и экспериментальных образцах, а также определение кислотного числа присутствующего в смеси масла. На данном этапе можно сделать вывод, что штаммы *P. chrysogenum* sp. ZCMC-02M и *P. goetpii* sp. ZCMC-01M могут использовать в качестве субстрата для роста смесь 50% кокосового волокна и 50% пальмового масла и являются перспективными для создания консорциума и использования в биоконверсии отходов производства пальмового масла.

Работа выполнена при поддержке Гранта № 075-15-2022-1152 (Постановление № 619 от 8 апреля 2022 г.).

Литература

1. Geng A. Upgrading of oil palm biomass to value-added products // Biomass and bioenergy: applications / Eds. Hakeem KR, Jawaid M, Rashid U. Cham: Springer International Publishing, 2014. P. 187–209.
2. Dominic D., Baidurah S. Recent developments in biological processing technology for palm oil mill effluent treatment – A Review // Biology. 2022. V.11. P. 525.
3. Демьянцева Е.Ю., Коннина Р.А. Ферментативный катализ в цбп: учебно-методическое пособие / СПбГТУРП. СПб., 2014, 1–47.

Активность гетерологичной стероидной дегидрогеназы KstD2 в различных организмах-хозяевах

Фуфаева С.Р., Довбня Д.В., Шутов А.А., Ивашина Т.В., 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.2023.17.38743

Ключевые слова: гетерологическая экспрессия, 3-кетостероид-1-дегидрогеназа, преднизолон, гидрокортизон, биотрансформация

Микробное 1(2)-дегидрирование 3-кетостероидов является основой для производства стероидных фармацевтических препаратов и синтонов. Способность осуществлять данную реакцию была продемонстрирована у представителей различных микробных таксонов, однако наиболее высоким уровнем активности обладают актинобактерии родов *Nocardoides*, *Mycolicibacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus* [1, 2].

Вместе с тем, при цельноклеточном биокатализе данной реакции растущими клетками штаммов дикого типа наблюдают нежелательное восстановление 20-карбонильной группы и обратную реакцию 1(2)-гидрирования продукта (рис. 1) [2].

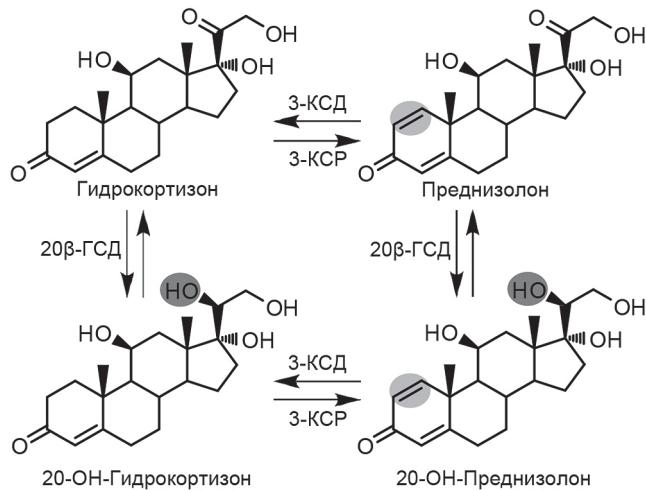


Рис. 1. Схема 3-кетостероид-1(2)-дегидрирования гидрокортизона и нежелательных побочных реакций

Осуществлена экспрессия целевого гена *kstD2* под контролем индуцибельного ацетамида и конститутивного *hsp60* промоторов в клетках двух штаммов микобактерий – *Mycolicibacterium neoaurum* NRRL B-3805 Δ *kstD* [1] и *Mycolicibacterium smegmatis* BD [4], способных к окислению стероидов, но с блокированной эндогенной активностью 3-КСД. В клетках *E. coli* BL21(DE3), но обладающих стероидным катаболизмом, *kstD2* экспрессирован под контролем промотора T7-бактериофага (рис. 2).

Активность гетерологической KstD2 в отношении гидрокортизона у растущих клеток бактерий-реципиентов сравнивали с активностью клеток *N. simplex* (рис. 3). Целевая активность была существенно ниже в случае штаммов *Mycolicibacterium* и сравнима с *N. simplex* в случае *E. coli*. При этом нежелательные побочные активности были существенно ниже в клетках *Mycolicibacterium* и отсутствовали в клетках *E. coli*.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 21-64-00024).

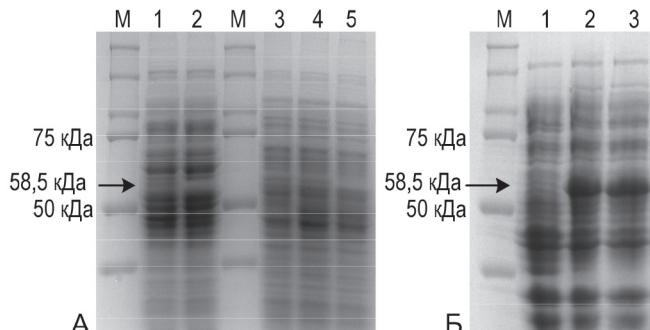


Рис. 2. Экспрессию KstD2 (58,5 кДа) подтверждают электрофорезом в SDS-ПААГ: (А) 1 – *M. neoaurum+kstD2* (Pami); 2 – отр. контроль *M. neoaurum*; 3 – *M. smegmatis+kstD2* (Pami); 4 – *M. smegmatis+kstD2* (Phsp); 5 – отр. контроль *M. smegmatis*; (Б) 1 – отр. контроль *E. coli*; 2 и 3 – *E. coli+kstD2*; М – маркеры молекулярной массы белков

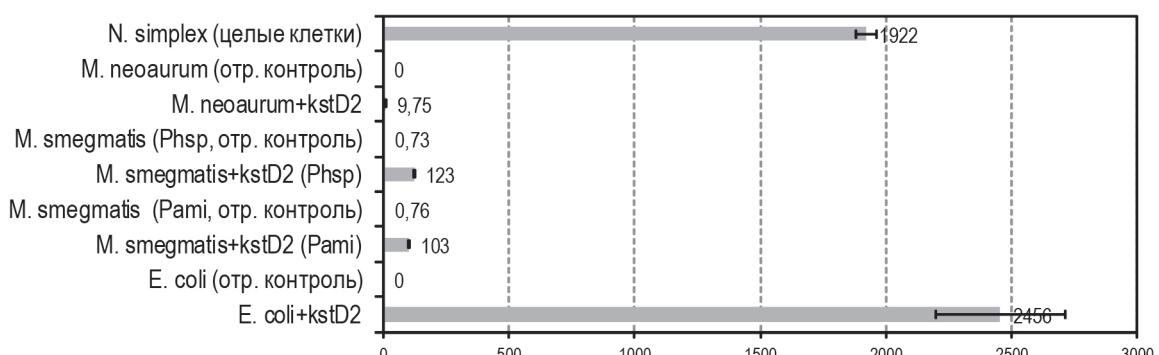


Рис. 3. Максимальная 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназная активность, мкмоль/час/г (сух. вес)

Решить проблему можно либо путем подавления нежелательной 20 β -редуцирующей активности, например у известного промышленного штамма-продуцента *Nocardoides simplex* BKM Ac-2033Д, либо реконструируя систему 1(2)-дегидрирования стероидов в штаммах, не обладающих нежелательной активностью. Следует отметить, что инженерия штаммов *N. simplex* неэффективна из-за отсутствия соответствующего генно-инженерного инструментария [3].

В данной работе проанализирована *in vivo* активность 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы (3-КСД) KstD2 (GenBank: AIY19529.1) из *N. simplex* BKM Ac-2033Д, гетерологически экспрессируемой под контролем двух различных промоторов в штаммах-реципиентах, как обладающих, так и не обладающих собственными системами окисления стероидов.

Литература

1. *Donova M.V., Egorova O.V.* Microbial Steroid Transformations: Current State and Prospects. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 94, 1423–1447.
2. *Fokina V.V., Sukhodol'skaya G.V., Gulevskaya S.A., Gavrish E.Yu., Evtushenko L.I., Donova M.V.* The 1(2)-Dehydrogenation of Steroid Substrates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. *Microbiology* 2003, 72, 24–29.
3. *Flegler A., Lipski A.* Engineered CRISPR/Cas9 System for Transcriptional Gene Silencing in Arthrobacter species Indicates Bacterioruberin Is Indispensable for Growth at Low Temperatures. *Curr Microbiol* 2022, 79, 199.
4. *Karpov M.V., Nikolaeva V.M., Fokina V.V., Shutov A.A., Kazantsev A.V., Strizhov N.I., Donova M.V.* Creation and Functional Analysis of *Mycolicibacterium smegmatis* Recombinant Strains Carrying the Bacillary Cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 Genes. *Appl Biochem Microbiol* 2022, 58, 947–957.

Исследование влияния вытяжек из лиственных фракций подстилок городской среды в качестве компонентов питательных сред на продуктивность и состав жирных кислот при культивировании микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Хлевная В.С.^{1,2}, Горин К.В.², Грачева Т.А.¹

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова

² НИЦ «Курчатовский институт»

xlevnaya@inbox.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38744

Ключевые слова: подстилка, микроводоросли, углекислый газ

Процессы, протекающие в почвах и подстилках, по разным оценкам, ответственны за образование от 25–40% до 90% диоксида углерода. Активность данного процесса напрямую зависит от таких параметров как прогреваемость подстилок и наличия влаги, что существенно возрастает в городских условиях за счет наличия большого числа твердого темного покрытия (асфальт, плитка), аккумулирующего тепло и препятствующего проникновению влаги в почву и полива улиц. В связи с этим актуальным является использование различных фракций подстилок для изготовления вытяжек и культивирования фототрофных микроорганизмов с целью снижения эмиссии диоксида углерода. Биомасса микроводоросли *Chlorella vulgaris* может быть использована для получения различных продуктов, таких как биоразлагаемый пластик, субстанции для фармакологии, пищевые добавки и многое другое. В данной работе была рассмотрена возможность получения биотоплива третьего поколения.

Объектом исследования выступила культура микроводорослей *Chlorella vulgaris* GKV 1. Образцы лиственной фракции подстилок были отобраны в зеленых насаждениях Воробьевых гор, а также близ детской площадки на окраине Битцевского парка.

Вытяжки изготавливались из лиственных фракций подстилок и дистиллированной воды в соотношении 1:25, смесь перемешивалась на качалке в течение часа, затем фильтровалась. Для культивирования использовались среды, изготовленные из вытяжек и дистиллированной воды в соотношении 1:9, в качестве контрольных образцов использовалась чистая среда ВВМ и среда ВВМ с добавлением глюкозы. Во время культивирования 1 раз в сутки проводилось измерение pH, снятие кривых роста при длинах волн 680 нм и 750 нм и подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева. Рост культуры происходил при круглосуточном перемешивании, освещении в течение дня и при поддержании температуры на уровне 22–25 °C. По окончании культивирования суспензия была отцентрифугирована, осажденная биомасса лиофильно высушена и использована для исследования состава жирных кислот и элементного состава.

Лучший рост был продемонстрирован на контрольных образцах, среди образцов с добавлением вытяжек лучший рост наблюдался при добавлении вытяжки из лиственной фракции подстилки, отобранный близ Битцевского парка (рис. 1.). При анализе биомассы было обнаружено относительно повышенное содержание предельных жирных кислот в исследуемых образцах. Данная характеристика важна, так

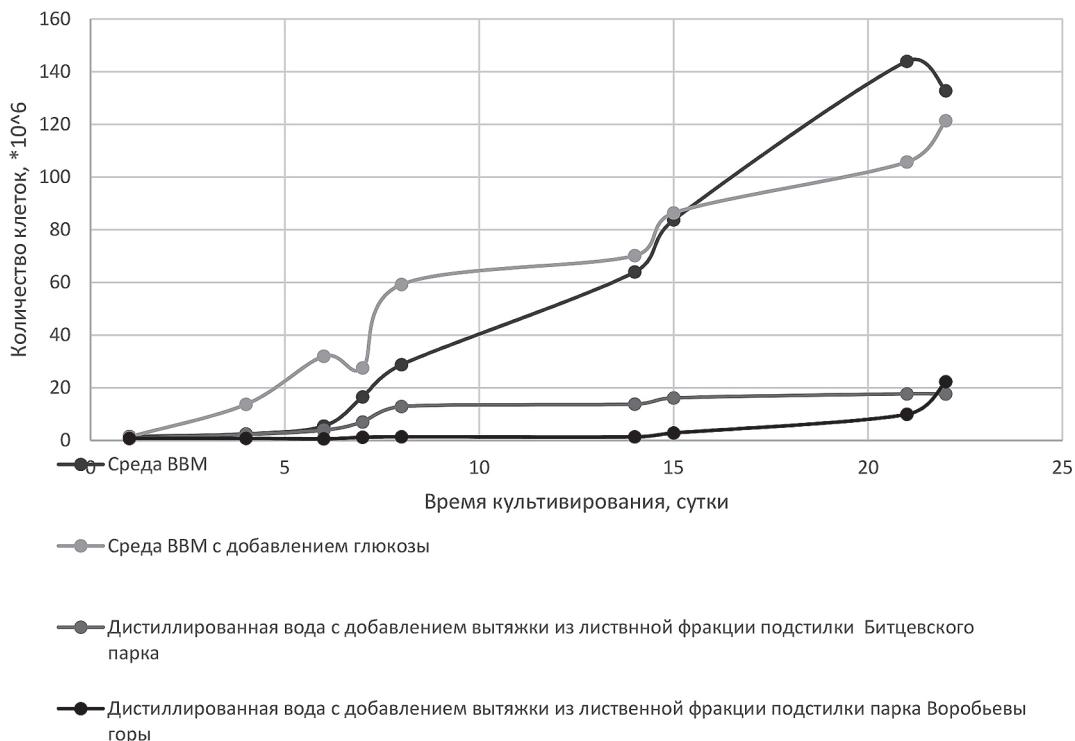


Рис. 1. Динамика роста *Chlorella vulgaris* на различных средах

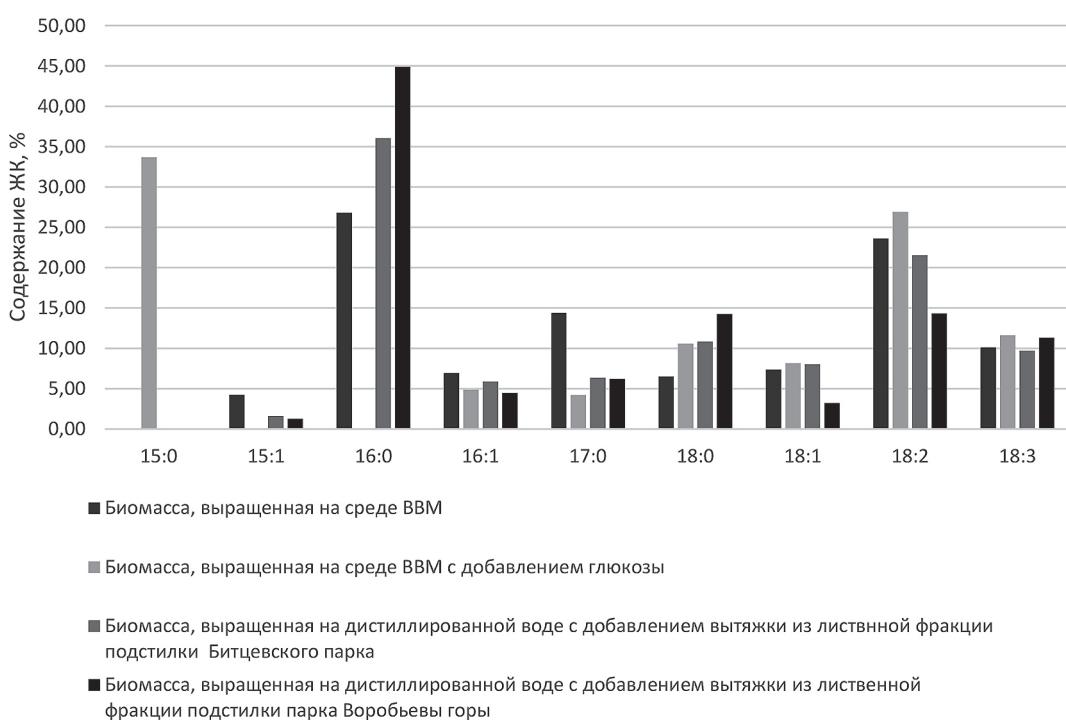


Рис. 2. Относительное содержание жирных кислот в биомассе *Chlorella vulgaris* после культивирования на различных средах

как при сжигании биотоплива большее количество энергии высвобождается при сжигании предельных жирных кислот, среди же непредельных более предпочтительными являются мононенасыщенные, а не полиненасыщенные (рис.2.).

***Serratia* sp. Asf1 – продуцент вторичного метаболита**

Хохлова Г.В., Антипова Т.В., Баскунов Б.П.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
galka889@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38745

Ключевые слова: *Serratia* sp. Asf1, вторичные метаболиты.

Быстрое распространение и появление бактерий и грибов с множественной лекарственной устойчивостью считается одной из основных угроз глобальному общественному здравоохранению. Вместе с этим многие бактерии производят биоактивные вторичные метаболиты, которые считаются многообещающими альтернативами известных антибиотиков [1]. В их число входят виды *Serratia*, которые представляют собой практически неиспользованный источник ценных вторичных метаболитов с потенциальной активностью против патогенов. Род *Serratia* выделяют из различных источников окружающей среды, таких как водная и морская среда, загрязненная почва, растения, животные или госпитализированные пациенты. Повсеместное распространение этого рода обусловлено синтезом многочисленных внеклеточных продуктов, включая экзоферменты и вторичные метаболиты, которые помогают *Serratia* адаптироваться к изменчивым и стрессовым условиям окружающей среды [2]. Одним из таких вторичных метаболитов является красный пигмент продигиозин, который проявляет антибактериальные, противо-грибковые, противопротозойные, противоопухолевые и иммунодепрессивные свойства. Виды *Serratia* способны синтезировать и другие биоактивные вторичные метаболиты, – такие, как биосурфактанты, ооцидин А, карбапенем, альтиомицин, серраветин и другие [3].

Целью данной работы был поиск новых вторичных метаболитов у штамма *Serratia* sp. Asf1. Штамм *Serratia* sp. Asf1 был выделен из пресного ручья в 2017 г. (Локация выделения – государственный геологический памятник природы в Терском районе Мурманской области). Ручей представлял собой экосистему с высоким содержанием железа: располагался на песчаниках с высоким содержанием лимонита и гематита. Штамм был отобран по способности расти на высоких концентрациях цитрата железа. Идентификацию штамма Asf1 проводили путем секвенирования 16S рРНК гена [4].

Штамм *Serratia* sp. Asf1 культивировали глубинно в колбах (750 мл) с 200 мл синтетической среды НРК следующего состава (г/л): глицерин 10 мл, 95 mM цитрат железа (III) 40 мл/л, пируват натрия 0.5, NaNO₃ 0.34, K₂HPO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄ 7H₂O 0.15. Выращивание проводили при температуре 28 °C в течение 3 сут. Биомассу отделяли центрифугированием при 5000 об./мин в течении 40 мин. Культуральную жидкость трижды экстрагировали этилацетатом в соотношении 3:1. Экстракт упаривали досуха на роторном испарителе. Полученный осадок анализировали с помощью ТСХ на пластинках силикагеля в различных системах растворителей. Метаболит выделяли с помощью препаративной ТСХ.

Анализ экстракта показал присутствие в пробе метаболита, который поглощал УФ-свет. УФ-спектр метаболита имел максимальные значения полос поглощения при λ_{max} 206, 228, 248 нм. Масс-спектр соединения имел отрицательный молекулярный ион 227 ($M-H^-$) и положительный молекулярный ион 229 ($M+H^+$). Полученные характеристики метаболита были использованы для поиска в базе данных природных соединений, однако соединений с подобными свойствами не было обнаружено. Планируется дальнейшее изучение структуры метаболита, которое возможно является новым соединением, и его биологической активности.

Литература

1. *Bérdy J.* Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 2005. 58, 1–26.
2. *Clements T., Ndlovu T., Khan W.* Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiol. Research.* 2019. V. 229. Art. 126329.
3. *Clements T., Ndlovu T., Khan S. et al.* Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V.103. P. 589–602.
4. *Хохлова Г.В., Антипова Т.В., Филатова И.Ю., Звонарев А.Н., Кулаковская Т.В., Вайнштейн М.Б.* Новый штамм *Serratia* sp. ASf1, растущий при высоких концентрациях железа. *Бактериология.* 2018. Т. 3 (1). С. 18–21.

Научное издание

**IX ВСЕРОССИЙСКАЯ ПУЩИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ»**

5–7 декабря 2023 г.

Сборник материалов конференции

Подписано к печати 00.11.2023

Формат 62×94/8. Печать офсетная.

Бумага офсетная, 80 г/м². Уч.-изд. 00 п.л. Тираж 00 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