

The background of the entire page is a dense, blue-tinted microscopic image showing a variety of bacterial shapes, including long rods, cocci, and more complex, filamentous structures. The lighting creates a sense of depth, with some bacteria appearing more prominent than others.

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

**XIII молодежная школа-конференция
с международным участием.**

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН.**

Москва, 16–18 ноября 2022 г.

Москва, 2022 г.

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

XIII молодежная школа-конференция с международным участием.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г.

Мероприятие организовано при поддержке
НЦМУ «Агротехнологии будущего»
(грант Минобрнауки России №075-15-2022-318 от 20.04.2022 г.)

Сателлитная конференция для молодых ученых
«Современная структурная биология» проводится в рамках
и при поддержке гранта Минобрнауки №075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

Москва,
2022

УДК 579(043.2)
ББК 28.4я43
А43



СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:



Программный комитет:

В.О. Попов, академик РАН – председатель; *В.Г. Дебабов*, академик РАН;
И.А. Тихонович, академик РАН; *Е.А. Бонч-Осмоловская*, член-корр. РАН;
А.К. Шайтан, член-корр. РАН; *А.Н. Федоров*, д.б.н.; *Н.В. Пименов*, д.б.н.; *Н.В. Равин*, д.б.н.;
А.П. Синицын, д.б.н.; *С.Н. Дедыш*, д.б.н.; *В.П. Варламов*, д.х.н.;
А.В. Марданов, д.б.н.; *А.Л. Степанов*, д.б.н.

Организационный комитет:

Н.В. Пименов, д.б.н. – сопредседатель; *Н.В. Равин*, д.б.н. – сопредседатель; *А.И. Александров*, к.б.н.;
С.Н. Дедыш, д.б.н.; *В.В. Миронов*, д.б.н.; *И.С. Мысякина*, д.б.н.; *А.В. Марданов*, д.б.н.;
Т.В. Хижняк, д.б.н.; *К.В. Шайтан*, д.ф.-м.н.; *Н.Н. Случанко*, д.б.н.; *Е.Г. Максимов*, д.б.н.;
А.М. Кампионская, к.б.н.; *Э.Г. Садыхов*, к.х.н.; *Н.Г. Степанова*, к.б.н.; *В.В. Кадников*, к.б.н.;
Ю.В. Литти, к.б.н.; *К.М. Бойко*, к.б.н.; *В.И. Борщевский*, к.ф.-м.н.; *А.Ш. Гаджикурбанов*;
А.Г. Осьмакова; *А.А. Фролова* – секретарь конференции

А43 **Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием.** Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г. – М. : ВАШ ФОРМАТ, 2022. – 286 с.

ISBN 978-5-00147-435-7

ISBN 978-5-00147-435-7



9 785001 474357

УДК 579(043.2)
ББК 28.4я43

© Коллектив авторов, 2022
© Институт микробиологии им. Н.С. Виноградского, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Е.С. Абрамова, Н.М. Попова, А.В. Сафонов
Микробные процессы в инженерных материалах и биоцидные добавки для их предотвращения 12

В.С. Алеев, Ю.И. Нечаева, А.А. Пьянкова, Е.Г. Плотникова
Угледородородокисляющие бактерии из шламоохранилища промышленной зоны г. Березники (пермский край) 14

В.А. Алексенко, И.Ю. Гущин
Филогеномика сенсорных родопсинов и трансдьюсеров..... 18

Е.О. Анисимова, А.В. Шутов, М.Г. Тарутина
Конструирование штамма-продуцента L-молочной кислоты на основе дрожжей *Schizosaccharomycetes pombe* 20

С.П. Баклагина
Влияние условий хранения на активность рекомбинантного фермента метанолдегидрогеназы, выделенной из *Methylogrubrum extorquens* pCM160 22

Д.А. Бахарева, Т.А. Федоренко, К.А. Шибзухова, П.А. Зайцев, А.А. Зайцева
Сравнительный анализ биотехнологического потенциала микроводорослей рода *Coelastrella*..... 25

К.В. Безматерных, А.В. Тюленев, Т.В. Калашникова, В.Ю. Ушаков, О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова
Влияние состава среды на гомеостаз цистеина у *Escherichia coli* при действии хлорамфеникола..... 27

В.В. Беленкова, О.Н. Лунина, Д.С. Груздев, В.В. Козяева, А.С. Саввичев, В.М. Горленко
Новые данные о сообществе аноксигенных фототрофных бактерий реликтового озера могильное (остров Кильдин)..... 30

А.С. Белоусов, И.В. Маслов, П.А. Хорн, А.С. Мишин, М.С. Баранов, А.В. Мишин, Е.Ю. Зерний, С.Е. Пермяков, В.И. Борщевский
Конформационные изменения белков возможно отслеживать с помощью красителей на основе хромофора GFP 33

Л.Р. Бикташева, А.С. Гордеев
Микробное сообщество нефтяных скважин ромашкинского месторождения 35

А.М. Бозиева, М.Х. Хасимов, Р.А. Волошин, М.А. Синетова, Е.В. Куприянова, С.К. Жармухамедов, С.И. Аллахвердиев
Цианобактерии как источник для получения биоводорода 38

Д.С. Буркатовский, А.О. Богородский, И.С. Охрименко, И.В. Маслов, В.И. Борщевский
Роль митохондриального импорта в возрастных нейродегенеративных и сердечно-сосудистых болезнях 41

А.Д. Бурцева, Т.Н. Баймухаметов, А.А. Дергалев, К.М. Бойко
Исследования ex vivo структуры прионного белка Sup35 из дрожжей
Saccharomyces cerevisiae методом крио-электронной микроскопии.....42

А.А. Бычкова, Ю.В. Зайцева
Влияние фосфора на образование биопленок бактериями рода *pseudomonas*..... 45

Л.А. Варфоломеева, А.Ю. Соловьева, Н.С. Шипков, Н.И. Дергоусова, Т.В. Ракитина, К.М. Бойко, Т.В. Тихонова, В.О. Попов
Консервативный остаток F436 не участвует в сборке медного кластера активного центра, но стабилизирует конформацию последнего в тиоцианатдегидрогеназе48

А.В. Гололобова, А.Г. Ельченинов, И.В. Кубланов, Е.Н. Фролов
Новая термофильная облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *Acetitalea autotrophica*.....50

Е.В. Груздев, В.В. Кадников, Ш.А. Бегматов, А.В. Марданов, Н.В. Равин
Сезонная структурная вариабельность микробных сообществ грунтовых вод города Москвы51

Е. В. Гурина, А.С. Васильченко, А.В. Яшников
Антимикробная аквтиность глиотоксина 53

Д.Е. Дашевский, А.П. Лугинина, П.А. Хорн, А.В. Мишин
Методы оценки взаимодействия GPCR с лигандами 55

Д.С. Дилбарян, О.В. Доманская, А.С. Васильченко
Антимикробные свойства гомолога макролактоина и сурфактинов определяют фитопротекторный эффект ризосферного микроорганизма – *Bacillus velezensis* X-BIO-157

Д.А. Доколин, Ю.В. Зайцева, И.В. Злобин
Распространение устойчивости к антибиотикам в микробном сообществе кишечника радужной форели (*Onchorhynchus mykiss*)59

Е.А. Дронова, Ю.Л. Рижиков, В.И. Горделий, А.И. Куклин
Исследование морфологических переходов, характерных для кристаллизации в липид-детергентных системах методом малоуглового рентгеновского рассеяния.....62

А.А.Дымова, Н.В. Костина, М.В. Голиченков
Особенности видового разнообразия бактериальных комплексов муравейников залежных земель65

А.А. Дымова, К.А. Шеф, С.В. Орлова, С.А. Харин, С.В. Поддубко
Среда обитания функционального грузового блока (ФГБ) РС МКС. Микробиологический мониторинг в течение последних пяти лет67

С.В. Егорова, С.Ю. Бут
Изучение альтернативных путей C1-ассимиляции у гаммапротеобактериальных метанотрофов методом мутагенеза69

Е.В. Емец
Анализ результатов полногеномного секвенирования новых штаммов цианобактерии *Trichormus variabilis*.....72

А.А. Зайцева, Т.А. Федоренко, К.А. Шибзухова, Д.А. Бахарева, П.А. Зайцев
Разнообразие жирнокислотного состава ряда штаммов каротиногенных микроводорослей.....75

М. Зарубин, Ю. Загрядская, Т. Муругова, А. Иваньков, Ю. Рыжиков, Д. Соловьев, И. Охрименко, А. Попов, Е. Кравченко
Структурные свойства неупорядоченного ДНК-связывающего белка тихоходок Dsup (Damage suppressor) с радиопротекторными свойствами77

А.П. Захарычева, Т.В. Хижняк
Рекомбинатные целлюлазы экстремально галоалкалофильной археи *Natronobiforma cellulositropha*.....79

И.В. Злобин, Ю.В. Зайцева
Разнообразие Quorum quenching бактерий в микробных сообществах рыб 82

А.В. Игнатенко, Т.В. Хижняк
Восстановление хроматов штаммами бактерий рода *Halomonas* sp. в различных условиях84

И.О. Илясов, А.Ю. Николаева, О.М. Субач, Ф.В. Субач, К.М. Бойко
Пространственные структуры красной и синей форм генетически-кодируемого флуоресцентного таймера Mrubyft для визуализации клеточного цикла87

Н.А. Имидоева, Е.В. Малыгина, М.Е. Дмитриева, Т.Ю. Тельнова, А.Ю. Бельишенко, М.М. Моргунова, В.Н. Шелковникова, Н.С. Колесов, В.А. Емишанова, Д.В. Аксёнов-Грибанов
Биоразнообразие и анализ антимикробной активности психрофильных бактерий-деструкторов озера Байкал88

Л.И. Искужина, М.А. Крючкова, А.О. Рожин
Ингибирование роста бактерии *Serratia marcescens* биогенными частицами серебра.....90

И.Р. Ишмухаметов, Г.И. Фахруллина, А.О. Рожин
Изучение динамики численности бактерии *Alcanivorax borkumensis*, культивируемой в нефтесодержащих буровых шламах.....93

Т.В. Калашикова, З.Ю. Самойлова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский
Использование микробных тест-систем для анализа биологической активности кормовых трав.....96

И. Капранов, М. Карпова, Ю. Загрядская, И. Охрименко, Т. Варакса, А. Гилеп, Н. Струшкевич, В. Борщевский
Микромасштабный термофорез в исследовании взаимодействия микобактериальных цитохромов P450 с азольными соединениями99

А.И. Карасева, А.Г. Ельченинов, А.А. Перевалова, К.С. Заюлина, Т.В. Кочеткова, И.В. Кубланов
Липолитические свойства термофильной археи *Fervidicoccus fontis* 101

М.А. Касаткина, Е.В. Плешакова
Ростовая характеристика микроорганизмов, высокоустойчивых к ионам марганца 103

А.С. Кашин
Апробация методики получения накопительных культур
микробных сообществ северных морей на полисахаридных субстратах
в ходе экспедиции «Арктический плавучий университет» 106

А.С. Кирюхина, Т.С. Лозовая, Е.А. Привалова, С.Н. Адамович
Использование одновременно дрожжевого экстракта и протатранов
для увеличения количества белка в клетках дрожжей *Candida ethanolica* 109

М.И. Ковалева, Е.В. Марьин, М.Н. Кадукова, Х.С. Мустафин,
А.В. Рогачев, А.В. Мишин, В.И. Борщевский
Ускорение молекулярного докинга методами машинного обучения 112

Н.К. Кондюрина, Ю.П. Федоненко
Стимуляция роста и индукция ответных биохимических
реакций проростков пшеницы *Triticum aestivum* L.
При воздействии липополисахарида *Azospirillum SOLI* CC-LY788(T) 115

А.А. Конопкин, Е.Н. Тихонова, Р.З. Сулейманов, С.Н. Дедыш
Новые изоляты бактерий рода *Methylomonas*,
синтезирующие каротиноиды, и их ростовые характеристики
в условиях непрерывного культивирования на метане 118

А.И. Косякова, О.С. Самылина, Т.П. Турова
Фиксация азота негетероцистными цианобактериями рода *Sodalinema*
из минерализованных озер..... 121

Ю.Н. Кочаровская, Я.А. Делеган
Вклад представителей рода *Gordonia* в биоремедиацию загрязненных почв
Ростовской области 124

М.С. Кузина, Е.Н. Сигида, В.С. Гринева, М.С. Кокоулин, Ю.П. Федоненко
Характеристика поверхностных гликанов бактерий рода *Halomonas*,
изолированных из образцов соли озера Сасык-Сиваш 127

А.С. Кузнецов, Е.Е. Куликов, А.К. Голомидова, А.В. Летаров
Потенциальная роль белка gr56 в адсорбции Stx-конвертирующего
бактериофага Φ24В 130

А.А. Кузьмицкая, Д.Ю. Побережный, С.В. Калёнов
Изучение взаимодействия культур *Microbacterium lacus*
и *Brevundimonas bullata* в условиях совместного культивирования..... 133

Д.Д. Куклина, Ю.Л. Рижиков, В.И. Горделий, А.И. Куклин
Реконструкция в нанодиски тримеров димеров комплекса
сенсорного родопсина II с его родственным трансдюсером..... 135

А.А. Лайкова, А.А. Ковалев, Д.А. Ковалев, Е.А. Журавлева, Ю.В. Литти
Последовательное однореакторное получение водорода и метана
анаэробным микробным сообществом за счет стимуляции гидрогеназной
активности ионами железа (II) и прямого межвидового переноса электронов
активированным углем..... 138

А.Р. Лаптева, Д.А. Подплетнев, М.Г. Тарутина
Сравнительная характеристика гликозилированной
и негликозилированной форм β-маннаназы, экспрессированных
в дрожжах *Ogataea haglerorum* 141

Т.Н. Лахова, Ф.В. Казанцев, А.М. Мухин, Д.Ю. Ощепков, С.А. Лашин
Метод для построения математических моделей регуляции транскрипции
бактерий на основе геномной информации..... 143

Т.И. Леонова
Влияние концентрации углеводородного субстрата на рост бактерий
Rhodococcus erythropolis X5 и на продукцию биосурфактанта 145

А.В. Леусенко, К.С. Миронов, Д.А. Лось
Роль PAS-домена сенсорной гистидинкиназы Hik33 в регуляции
стрессовых ответов у *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L..... 148

З.Н. Литвиненко, Л.М. Кондратьева
Сукцессия микробных комплексов при очистке
железосодержащих подземных вод..... 151

Т.И. Ловдина
Сравнение таксономического разнообразия прокариот меромиктического
озера Светлое на основе результатов секвенирования
различных участков гена 16S рРНК 154

А.Э. Макарова, Г.Ю. Юринова, Ю.П. Джигоев
Сравнительная оценка эффектов ростостимуляции пробиотика
Lactobacillus acidophilus несколькими природными полисахаридами 157

А.И. Мальцева, А.Г. Ельченинов, И.В. Кубланов, Е.Н. Фролов
Одновременное функционирование двух путей автотрофной ассимиляции
углерода у термофильной бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus*..... 160

Е.С. Мартыненко
Распределение культивируемых форм железо– и марганецоксилирующих
микроорганизмов в почвах, подверженных фитомелиорации 162

М.Н. Маслов, Л.А. Поздняков, А.А. Астайкина
Влияние дождевых червей *Lumbricus terrestris* на образование закиси
азота микробным сообществом агродерново-подзолистой почвы 164

О.А. Маслова
Характеристика плазмиды pPPUT-TIK-1 из штамма *Pseudomonas putida*,
выделенного из многолетнемерзлых отложений 167

Г.А. Матвеев, Е.Я. Подоляк, Ф.М. Цыбров, Д.В. Забельский, К.В. Ковалёв, А.А. Алексеев
Полурациональная оптимизация вирусного канального родопсина VirChR1 при помощи сайт-специфического мутагенеза169

И.О. Матюта, Д.Л. Атрошенко, Е.П. Сергеев, К.М. Бойко, В.И. Тишков
Структурные основы высокой термостабильности оксидазы d-аминокислот термофильных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1173

Е.А. Богатыренко, А.В. Ким, А.Д. Медведева
Выявление маркерных генов деструкции пау у углеводородокисляющих бактерий, выделенных из акваторий японского моря175

О.И. Мельников, О.Н. Розова
Утилизация маннита факультативным метилотрофом *Methylobrevis ramukkalensis* PK2.....179

Е.С. Морозова, Е.В. Крючкова
Катаболизм коричной кислоты и её производных штаммом *Achromobacter insolitus* LCu2181

Х.С. Мустафин, П.И. Буслаев, И.Ю. Гуцин
Применение метода главных компонент для анализа конформационной динамики липидных молекул184

Ю.И. Нечаева, Е.С. Корсакова, Е.Г. Плотникова
Анализ pht-генов деструкции орто-фталевой кислоты галотолерантного штамма рода *Arthrobacter*.....186

В.А. Никиткин, И.В. Луцаева, Н.Н. Терещенко, Э.Г. Никиткина, Л.Г. Колесниченко
Стратегии распределения эколого-трофических групп микроорганизмов в торфяных криогенных почвах Западной Сибири189

Э.Г. Никиткина, И.В. Луцаева, В.А. Никиткин, Т.В. Раудина, Л.Г. Колесниченко
Влияние гетеротрофных бактерий на растворенный органический углерод в растительных фильтрах191

А.С. Ничипоренко, Д.А. Антонова, В.А. Касьянов, И.В. Курдюмова, М.В. Якунина
Поиск фаговых белков, останавливающих рост клетки, на примере бактериофага Phikz193

И.А. Пантюшин, т.Л. Гордеева, с.П. Синеокий
Клонирование и экспрессия гена, кодирующего глюкоамилазу из *Rasamsonia emersonii*, в *Komagataella mondaviorum*195

А.В. Пелевина, Ю.Ю. Берестовская, Е.В. Груздев, В.В. Сорокин, О.В. Слатинская, А.В. Марданов
Особенности формирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия197

Т.И. Дункай, Е.О. Писарева, Е.А. Богатыренко
Разнообразие протеобактерий в сообществах донных отложений прибрежных акваторий Приморского края, выявленное в ходе метагеномного анализа.....200

Д.А. Подплетнев, А.Р. лаптева, М.Г. Тарутина
Сравнительная характеристика промоторов гена метанолоксидазы из дрожжей *Ogataea polymorpha* и *Ogataea haglerorum*.....203

Н.М. Попова, А.В. Сафонов, А.В. Вишнякова, Ю.В. Литти
Разнообразие микробных сообществ подземных вод в районе шламохранилища АО «ЧМЗ»205

В.А. Поспелов, В.И. Борщевский
Метод фазирования основанный на комплексе хелатируемого GD207

В.В. Потокينا, Ю.В. Литти, С.Н. Паришина
Биоразнообразие метаногенных микробных сообществ систем анаэробной обработки органических отходов.....209

Н.В. Растрига, Д.А. Гасанова, С.А. Смирнов, П.А. Левашов
Связь между бактериолитической активностью лизоцима и сорбцией фермента на живых бактериальных клетках кишечной палочки в присутствии низкомолекулярных эффекторов211

Ю. Л. Рижиков, А.В. Власов, В.И. Горделий, А.И. Куклин
Неоднозначность и полнота данных малоуглового рассеяния при исследовании солубилизированных мембранных белков.....213

В.В. Розаницева, К.Э. Ануфриев, М.Е. Шереметьева, Л.Е. Рябченко, Т.Е. Леонова, Т.И. Калинина, А.С. Яненко
Модификация систем транспорта L-валина у *Corynebacterium glutamicum* для повышения продукции данной аминокислоты215

М.В. Романова, С.А. Евдокимова, Н.Ю. Хромова, А.В. Белодед
Биохимический и генетический скрининг термофильных штаммов бактерий – потенциальных продуцентов молочной кислоты.....217

Д.А. Русакова, М.Л. Сидоренко
Антагонистические взаимоотношения между психрофильными и условно-патогенными микроорганизмами.....220

Ю.Ю. Рысева, Е.Г. Лебедева, А.М. Паничев
Исследование культивируемой микрофлоры содержимого желудочно-кишечного тракта животных-геофагов, обитающих в Приморском крае222

А.С. Рябова, Л.Ю. Кузьмина, Е.А. Гильванова, Н.Ф. Галимзянова, Т.Н. Архипова
Пещеры – источник биотехнологически перспективных штаммов микроорганизмов (на примере пещеры Киндерлинская)225

А.А. Садова, Д.А. Дмитриева, А.В. Мишин
Оптимизация условий экспрессии нанотела Nb6 в E.Coli 228

К.В. Сазанова, М.С. Зеленская, А.Л. Шаварда, Д.Ю. Власов
Микроорганизмы в субаэральных биопленках на поверхности памятников
из мрамора и гранита в Санкт-Петербурге 230

А.А. Самков, Ю.А. Чугунова, М.Н. Круглова, Е.В. Моисеева, Н.Н. Волченко,
А.А. Худокормов, Е.В. Панкратова, П.А. Павлова, Э.В. Карасева
Биодеградация ксенобиотиков в биоэлектрохимической системе
в зависимости от внешней электрической стимуляции и микробного агента 234

А.Я. Сафинова, Н.Е. Беликов, Л.Е. Петровская,
А.Ю. Лукин, О.В. Демина, С.Д. Варфоломеев, А.А. Ходонов
Исследование спектральных свойств модели хромофорного центра
бактериальных родопсинов 236

У.И. Сафьянникова, Л.Э. Алескерова
Сообщество углеводородокисляющих микроорганизмов
для ремедиации нефтяных загрязнений 239

А.О. Светлова, М.А. Карасёва, И.В. Демидюк
Эмфориноподобный белковый ингибитор из Photorhabdus laumondii
регулирует токсичность протеазы S при экспрессии в E. Coli 242

А.Д. Смолякова
Закономерности распределения ртути в компонентах природной среды
гидротермальных источников Байкальской рифтовой зоны 245

Л.В. Сокольников, Д.С. Бульмакова, А.Д. Сулейманова
Высвобождение фосфора из трикальцийфосфата штаммом Pantoea brenneri 3.5.2
и влияние компонентов питательной среды на эффективность солюбилизации 247

В.В. Суворова
Воздействие факторов окружающей среды на биохимические особенности
бактерий-деструкторов углеводородов нефти 249

Р.З. Сулейманов, И.Ю. Ошкин, Е.Н. Тихонова, С.Н. Дедыш
Новый вид термотолерантных метанотрофных бактерий рода Methylomonas
с высокими ростовыми характеристиками 252

К.А. Тарасов, А.С. Яхненко, М.П. Зарубин, А.М. Гангапиев, Е.В. Кравченко
Cytobacillus pseudocyanisediminis, новая факультативно-метилотрофная бактерия
с высокой резистентностью к тяжелым металлам,
выделенная из подземного соленого источника 255

Т.А. Тимофеева, В.П. Варламов, А.М. Камионская
Изучение активности генов корней томата при обработке гидролизатом хитозана 256

Ю.С. Топилина, Е.А. Лукьянова, Л.Б. Глухова, М.Н. Шурупова, А.Л. Герасимчук, Д.В. Анциферов
Влияние эндомикоризообразующих грибов-микромикотетов рода Cadophora
на развитие микрорклонов плодово-ягодных культур 258

А.В. Тюленев, Г.В. Смирнова, А.О. Габова, О.Н. Октябрьский
Изменение физиологических параметров аэробнорастущих
бактерий Escherichia coli при стрессе голода по сульфату 261

В.В. Федина
Сравнительная оценка производительности макетов биотопливных элементов
с использованием ферментов лакказ в катодном пространстве 263

А.А. Фролова, А.Ю. Меркель, В.В. Кевбрин, Д.С. Копицын, А.И. Слободкин
Sulfurospirillum tamanensis sp. Nov. –
Новая факультативно анаэробная, алкалифильная бактерия
из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова 266

Е.Г. Лебедева, Р.И. Хисматулина, А.М. Паничев
Биологические свойства микроорганизмов, выделенных из горных пород
Приморского края и Республики Алтай 268

А.В. Шабаев, О.С. Савинова
Биодеструкция диизобутилфталата (ДиБФ) и бутилбензил фталата (ББФ)
грибом белой гнили Trametes hirsuta 271

Д.А. Швеи, К.А. Сandomирский, Е.В. Поротикова, С.В. Виноградова
Использование методов метагеномики для изучения вирома коллекций винограда 274

В.Н. Шелковникова, М.Е. Дмитриева, А.Ю. Бельишенко, Е.В. Малыгина,
М.М. Моргунова, Н.А. Имидоева, Т.Ю. Тельнова, А.А.Власова, Д.В. Аксёнов-Грибанов
Анализ метагеномных сообществ и синтеза природных соединений
у оксифильных микроорганизмов озера Байкал 276

С.В. Шехурдина, Е.А. Журавлева, Ю.В. Литти
Протекание различных типов прямого межвидового переноса электронов
в биопленках при анаэробном сбраживании высококонцентрированных
летучих жирных кислот в зависимости от инокулята
и электропроводности материала-носителя 278

Е.Г. Шурыгина, Т.Л. Гордеева, С.П. Синеокий
Сравнение экспрессионного потенциала различных штаммов
метилотрофных дрожжей Komagataella monodavium 280

А.В. Яшников, О.В. Доманская, Е.В. Гурина, А.С. Васильченко
Влияние экстракта эвкалипта (Eucalypti viminalis folia)
на вирулентность Pectobacterium carotovorum 282

МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ИНЖЕНЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ И БИОЦИДНЫЕ ДОБАВКИ ДЛЯ ИХ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ

Е.С. Абрамова¹, Н.М. Попова², А.В. Сафонов³

Долговременная изоляция радиоактивных отходов (РАО) в соответствии с требованиями Международного агентства по атомной энергетике должна производиться в системе инженерных барьеров, обеспечивающих безопасное захоронение РАО. Глины благодаря своим сорбционным и антифильтрационным свойствам рассматриваются в качестве буферного материала в концепции хранилищ РАО во многих странах (Франция, Канада, Швейцария), в том числе и в России. При расчете стабильности как самих глинистых материалов, так и материалов, имеющих с ними прямой контакт (сталь, бетон и др.), необходимо учитывать вклад биогенных и биогенно-опосредованных процессов. В системе инженерных барьеров безопасности (ИББ) глина сама может являться источником микрофлоры, а также может быть донором биофильных элементов для развития аборигенной микрофлоры.

Одним из путей, способствующих снижению микробной активности в глинистых материалах, является их уплотнение до плотности выше 1,5 г/см³. Однако в соответствии с данными работ [1-4] микробная активность наблюдается на поверхности и в зоне контакта с другими материалами ИББ. Альтернативным способом является внесение биоцидных соединений, не теряющих своей химической активности, устойчивых и имеющих пролонгированное действие в условиях глубинного хранилища РАО.

Целью данной работы является оценка устойчивости глинистых материалов к воздействию микроорганизмов, а также поиск эффективных биоцидных добавок, предотвращающих рост микробиоты в условиях пункта глубинного подземного захоронения РАО.

На основании анализа данных филогенетического разнообразия 16S рРНК проб глин бентонитового и каолинового типов обнаружены микроорганизмы, преимущественно бродильного типа метаболизма, а также способные использовать сульфат и железо в качестве акцепторов электронов. Установлено, что стимулирование роста

наблюдалось при добавлении продуктов радиолиза, продуктов коррозии стали и микробных газов. Проведена оценка интенсивности выщелачивания основных структурных элементов глинистых минералов (алюминия и кремния), а также накопления сероводорода, который играет важную роль в безопасности металлических и цементных материалов в ИББ.

Для уменьшения биогенного влияния на целостность глинистых материалов изучен ряд биоцидных добавок. Установлено, что полигексаметилгуанидин (ПГМГ) в концентрации 0,5 масс. % является наиболее эффективным биоцидом, не теряющим своих свойств при контакте с глиной, а также проявляет температурную устойчивость до 700С.

Список литературы:

1. Haynes H.M., Bailey M.T., Lloyd J.R. Bentonite barrier materials and the control of microbial processes: Safety case implications for the geological disposal of radioactive waste //Chemical Geology. – 58(1). – 2021. – 120353.
2. Villar M.V., Gomez-Espina R., Campos R., et al. Porosity changes due to hydration of compacted bentonite. In: Mancuso, C., Jommi, C., D'Onza, F. (Eds.) //Unsaturated Soils: Research and Applications. Springer, Berlin, Heidelberg, – 2012. – P. 137–144.
3. Pedersen K. Analysis of copper corrosion in compacted bentonite clay as a function of clay density and growth conditions for sulfate-reducing bacteria //Applied Microbiology. – 108(3). – 2010. – P.1094-1104.
4. Povedano-Priego C., et al. Deciphering indigenous bacteria in compacted bentonite through a novel and efficient DNA extraction method: Insights into biogeochemical processes within the Deep Geological Disposal of nuclear waste concept //Journal of Hazardous Materials. – 408. – 2021. – 124600.

¹ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина Российской академии наук.

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина Российской академии наук.

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина Российской академии наук.

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ
ИЗ ШЛАМОХРАНИЛИЩА ПРОМЫШЛЕННОЙ ЗОНЫ
Г. БЕРЕЗНИКИ (ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

В. С. Алеев⁴, Ю. И. Нечаева⁵, А. А. Пьянкова⁶, Е. Г. Плотникова⁷

В промышленном районе города Березники (Пермский край) расположены предприятия химической (ОАО «Азот», АО «Березниковский содовый завод») и соледобывающей (ПАО «Уралкалий») промышленности, при работе которых образуются отходы, складированные в шламохранилищах, отстойниках и солеотвалах. Экологические условия в шламохранилищах (высокие концентрации солей и значения рН, наличие токсичных органических соединений) способствуют формированию уникальных сообществ экстремофильных микроорганизмов. Микроорганизмы, способные осуществлять разложение алифатических и ароматических углеводородов (распространенных загрязнителей окружающей среды) в присутствии высоких концентраций соли и рН, востребованы для разработки новых технологий восстановления загрязненных территорий [1]. Цель работы – выделение и характеристика бактерий из шламохранилища (г. Березники), способных использовать дизельное топливо и ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии в условиях засоления и высокой щелочности.

В работе использовали образцы донных отложений, которые были отобраны из шламохранилища, расположенного на территории г. Березники (Пермский край). Общая минерализация образцов варьировала в пределах от 49 до 196 г/кг, рН образцов – от 10 до 11,5. Содержание нефтепродуктов в образцах составляло 142 – 1075 мг/кг.

Образцы донных отложений (1 г/л) культивировали в 100 мл модифицированной среды Пфеннига (г/л): NH₄Cl – 0,5; KH₂PO₄ – 0,5; MgCl₂ – 0,5; CaCl₂ – 0,05; NaCl – 100; дрожжевой экстракт – 0,5; пептон – 5; рН 9,5; в течение 3 недель при температуре 28°С, после чего осуществляли высев суспензии на агаризованную среду Пфеннига (15 г/л агара) с содержанием 100 г/л NaCl. Отбор отдельных штаммов бактерий осуществляли при наличии морфологических отличий колоний. Идентификацию отобранных штаммов

⁴ ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.
«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.
⁵ ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.
«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.
⁶ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.
⁷ ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.
«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.

проводили на основе анализа гена 16S рРНК. ДНК выделяли из бактериальных клеток методом «щелочного лизиса». Амплификацию, определение нуклеотидных последовательностей и анализ генов 16S рРНК осуществляли, как описано [2].

Способность бактерий разлагать органические соединения оценивали путём культивирования в жидкой минеральной среде Пфеннига (50 г/л NaCl, рН 9,5) с добавлением нафталина (Наф), бифенила (Биф), бензойной (БК) и орто-фталевой кислот (ОФК), дизельного топлива (ДТ) в концентрации 1 г/л. Рост штаммов оценивали при определении оптической плотности культуры (ОП600) на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) на 7 день культивирования.

В результате проведенных исследований выделено 19 штаммов бактерий, продемонстрировавших способность использовать ДТ и нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии в условиях высокой солености (50 г/л NaCl) и щелочности среды (рН 9,5). Кроме того, штаммы росли на бифениле, орто-фталатевой и бензойной кислотах (таблица). Исследуемые бактерии также способны к росту на вышеперечисленных субстратах при нейтральных показателях среды (рН 7,0).

Таблица
Характеристика галоалкалотолерантных бактерий-деструкторов

Штамм	Ближайший типовой штамм (номер GenBank), % сходства	Органические субстраты				
		ДТ	Наф	Биф	ОФК	БК
CX3-2	Oceanobacillus kimchii X50 ^T (AOCX01000002), 100	++	++	++	-	-
CX3-4	Salipaludibacillus neizhouensis JSM 071004 ^T (EU925618), 98,71	++	-	-	-	-
CX3-18	Evansella polygoni YN-1 ^T (AB292819), 100	++	++	+	-	-
CX2-1	Evansella clarkii DSM 8720 ^T (KV917376), 100	++	++	++	+	+
CXP-23	Exiguobacterium mexicanum 8N ^T (AM072764), 100	+	+	+	+	+
CX2-8	Halomonas meridian DSM 5425 ^T (AJ306891), 100	++	++	++	++	++
CX3-1	Halomonas alkalicola 56-L4-10aEn ^T (KU530128), 99	++	-	+	-	-
CX2-7	Micrococcus luteus NCTC 2665 ^T (CP001628), 100	++	++	++	-	-
CXP-7	Micrococcus endophyticus YIM 56238 ^T (EU005372), 100	++	+	+	+	+
CXP-15	M. terreus CGMCC 1.7054 ^T (jgi.1058018), 100	++	+	++	++	++
CXP-33	Kocuria palustris DSM 11925 ^T (Y16263), 99,47	+	+	++	++	++
CXP-14	Kocuria palustris DSM 11925 ^T (Y16263), 99,65	+	+	+	+	+
CXP-13	Kocuria carniphila CCM 132 ^T (AJ622907), 99,65	++	++	++	++	++
CXP-56	Microbacterium algeriense G1 ^T (MK480726), 100	++	+	++	+	++
CXP-21	Brevibacterium pityocampae DSM 21720 ^T (EU484189), 99,87	++	+	+	++	+

Штамм	Ближайший типовой штамм (номер GenBank), % сходства	Органические субстраты				
		ДТ	Наф	Биф	ОФК	БК
CXP-53	B. ptyocampae DSM 21720 ^T (EU484189), 100	+	+	+	+	+
CXP-24	Dietzia kunjamensis subsp. kunjamensis DSM 44907 ^T (RAQB01000007), 100	++	-	-	-	++
CXP-46	Brachybacterium muris C3H-21 ^T (AJ537574), 100	++	+	+	+	+
CXP-58	Brachybacterium paraconglomeratum LMG 19861 ^T (AJ415377), 99,87	++	+	++	+	+

Примечание. (+) – ОП600 = 0,2-0,3; (++) – ОП600 = 0,4-1,0; (-) – изменения ОП600 не наблюдалось.

В геномах исследуемых бактерий проведен поиск генов, контролирующих разложение алифатических и ароматических углеводов, бифенила и бензоата, при использовании праймеров [3-6]. Гены алкан-1-монооксигеназы (alkB) выявлены у штаммов CX2-8 и CXP-24; гены бензоат 1,2-диоксигеназы (benA) – у штаммов CXP-15, CXP-13; гены бифенил 2,3-диоксигеназы (bphA) – у штамма CX2-8; гены диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо (PAH-RHD α) – у штамма CX2-7.

Проведенные исследования показали, что выделенные галоалкалотолерантные углеводородокисляющие бактерии представляют интерес для дальнейших исследований с целью их возможного использования в экобиотехнологических мероприятиях по очистке загрязненных щелочных/засоленных объектов окружающей среды.

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

Список литературы:

1. Морозкина Е. В. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение / Е. В. Морозкина, Э. С. Слуцкая, Т. В. Федорова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 5-20.

2. Пьянкова А. А. Бактерии-деструкторы бензойной кислоты семейства Halomonadaceae, выделенные из района солеразработок: видовое разнообразие и анализ benA-генов / А. А. Пьянкова, Е. Г. Плотникова // Микробиология. – 2022. – Т. 91, №. 1. – С. 102-115.

3. Wang L. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean / L. Wang, W. Wang, Q. Lai, Z. Shao // Environ. Microbiol. – 2010. – V. 12, №. 5. – P. 1230-1242.

4. Baggi G. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: effect of the position and number of halo-substituents / G. Baggi, S. Bernasconi, M. Zangrossi [et al.] // Int. Biodeter. Biodegr. – 2008. – V. 62. – P. 57-64.

5. Cébron A. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDalpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. / A. Cébron, M. Norini, T. Beguiristain, C. Leyval // Microbiol. Methods. – 2008. – V. 73, № 2 – P. 148-59.

6. Baldwin B. R. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR / B. R. Baldwin, C. H. Nakatsu, L. Nies // Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, № 6. – P. 3350-3358.

ФИЛОГЕНОМИКА СЕНСОРНЫХ РОДОПСИНОВ И ТРАНСДЬЮСЕРОВ

В. А. Алексенко⁸, И. Ю. Гущин⁹

Системы сигнальной трансдукции регулируют важнейшие клеточные процессы во всех живых организмах. Основным механизмом передачи сигналов в прокариотах являются ДКС (двухкомпонентные регуляторные системы) [1,2]. Значительно меньше ДКС распространены в эукариотах и вообще отсутствуют у млекопитающих, поэтому их считают потенциальными мишенями для лекарств [3]. ДКС состоят из сенсора и регулятора ответа, репертуар которых в составе клетки зачастую весьма многочисленен и разнообразен [1,4]. Благодаря богатому арсеналу сенсоров, микроорганизмы способны к хемотаксису в ответ на самые различные химические стимулы, а также к фототаксису в ответ на различные длины волн улавливаемого света, что позволяет оперативно реагировать на малейшие изменения в окружающей среде [1,4]. Хеморецепторы, одиночные белки (одиночные в составе одной ДКС, тогда как локализованные поблизости группируются в мегакомплексы), играют роль сенсорной компоненты в хемотаксических ДКС, тогда как эту роль в фототаксисе исполняют два взаимодействующих белка – сенсорный родопсин и трансдюсер [1,5]. По сравнению с хеморецепторами и родопсинами, трансдюсеры изучены значительно меньше. В данной работе исследуются сенсорные трансдюсеры в контексте функциональных и эволюционных взаимоотношений с родопсинами и хеморецепторами. Фундаментальный вопрос, поднятый к рассмотрению в работе, касается эволюционного происхождения сенсорных трансдюсеров. Одно из предположений состоит в том, что трансдюсеры возникли от хеморецепторов в момент геномной перестройки, когда сенсорный родопсин и трансдюсер оказались по соседству и это событие возможно произошло неоднократно. Ключевое отличие сенсорных трансдюсеров от хеморецепторов состоит в частичном или полном вырождении внеклеточного сенсорного домена. Таким образом, в работе также ставится вопрос о том, какова роль и степень разнообразия сенсорного домена у трансдюсеров. Для проверки озвученных и некоторых других гипотез, в работе проводится филогенетический анализ генов сенсорных трансдюсеров и отдельных доменов совместно с исследованием их геномного окружения. Полученные в работе ответы выявляют молекулярно-филогенетические критерии, задающие функциональные и структурные особенности сенсорных ро-

допсинов и трансдюсеров, что также дает более полное понимание устройства ДКС и механизма передачи сигналов в целом.

Список литературы:

1. Gushchin I., Gordeliy V. Transmembrane Signal Transduction in Two-Component Systems: Piston, Scissoring, or Helical Rotation? // *BioEssays*. 2018b. Т. 40. № 2. С. 1700197.
2. Wuichet K., Zhulin I. B. Origins and Diversification of a Complex Signal Transduction System in Prokaryotes // *Sci Signal*. 2010. Т. 3. № 128. С. ra50.
3. Bem A. E. и др. Bacterial Histidine Kinases as Novel Antibacterial Drug Targets // *ACS Chem. Biol*. 2015. Т. 10. № 1. С. 213–224.
4. Yamamoto K. и др. Functional Characterization in Vitro of All Two-component Signal Transduction Systems from *Escherichia coli** // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Т. 280. № 2. С. 1448–1456.
5. Gushchin I., Gordeliy V. Microbial Rhodopsins // *Membrane Protein Complexes: Structure and Function Subcellular Biochemistry*. / под ред. J. R. Harris, E. J. Boekema. Singapore: Springer, 2018a. С. 19–56.

⁸ Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия

⁹ Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА L-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Е.О. Анисимова¹⁰, А.В. Шутов¹¹, М.Г. Тарутина¹²

Молочная кислота (МК) является химической платформой для производства различных материалов и применяется во многих сферах промышленности. В последнее время всё большую актуальность приобретает использование молочной кислоты для синтеза полилактидов — биodeградируемых полимеров, способных полностью либо частично заменить синтетические полимеры (полиэтилен, полипропилен и т.п.). Полилактид имеет множество областей применения: экологически чистая биоразлагаемая упаковка, одноразовая посуда, средства личной гигиены; применение в медицине для производства хирургических нитей (полигликолид), имплантатов и штифтов и пр.

Актуальной задачей для получения МК микробиологическим путём из возобновляемых ресурсов является конструирование высокопродуктивных продуцентов на основе штаммов-реципиентов, устойчивых к низким значениям pH и высоким концентрациям МК в культуральной жидкости.

Целью данной работы было создание штамма-продуцента МК на основе кислотоустойчивого штамма дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*.

Делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* – объект с хорошо развитой генетикой и секвенированным геномом, применяются в гидролизно-спиртовом производстве наряду с различными штаммами спиртообразующих дрожжей. Поскольку дрожжи *S. pombe* активно переводят глюкозу в этанол, для получения штаммов-продуцентов необходимо блокировать полностью или частично пути биосинтеза этанола. Одним из способов перенаправления потока углерода к желаемому продукту является инактивация генов пируватдекарбоксилаз (PDC), ответственных за конверсию пирувата в ацетальдегид (интермедиат для образования этанола). Известно, что для конструирования продуцентов на дрожжах *S. pombe* используют штаммы с делециями генов *PDC1* и *PDC2* [1].

Поскольку в природных условиях дрожжи *S. pombe* не способны продуцировать МК, экспрессия в них гетерологичных генов лактатдегидрогеназ (LDH) с высокой активностью позволяет получить продуценты на этом микроорганизме. Источни-

ком генов для экспрессии в дрожжах обычно являются гены *LDH* из молочнокислых бактерий.

В результате данной работы получен рекомбинантный штамм дрожжей *S. pombe* Sp-МК6 с делетированным геном пируватдекарбоксилазы *PDC1*, несущий в составе хромосомы гетерологичные гены лактатдегидрогеназ из *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus helveticus*. Полученный штамм продуцирует L-молочную кислоту в количестве 125 г/л за 72 часа культивирования в ферментёре в аэробных условиях. Конверсия 56%, скорость синтеза 1.7 г/л/ч, конечный pH = 2.7.

Штамм дрожжей *S. pombe* Sp-МК6 является прототрофом и способен продуцировать L-молочную кислоту при культивировании без pH-статирования на среде с кукурузным экстрактом - отходом крахмалопаточного и глюкозного производства, не обладает антибиотикорезистентностью.

По результатам проведенной работы получен патент РФ [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075-15-2019-1659).

Список литературы:

1. Aiko O., Rie K., Chisako O., Mayumi K., Seiya T., Takuya M., Tsutomu T., Akihiko K. Metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* via CRISPR-Cas9 genome editing for lactic acid production from glucose and cellobiose // Metabolic Engineering Communications. – 2017. – Vol. 5. – P.60 – 67.
2. RU 2752896 C1. Анисимова Е.О., Тарутина М.Г., Шутов А.В., Федоров А.С., Си-неокий С.П. Штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, продуцирующий L-молочную кислоту, содержащий в составе хромосомы гены трех различных гетерологичных лактатдегидрогеназ. Дата публикации: 11.08.2021, Бюл. № 23.

¹⁰ НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

¹¹ НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

¹² НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ
РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА
МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ
ИЗ METHYLORUBRUM EXTORQUENS РСМ160

С.П. Баклагина¹³

Метилотрофы служат основными биологическими поглотителями метана и других метилированных парниковых газов, а также используются в качестве средств биоремедиации и производстве топлива и химикатов. Распространенным метилотрофным организмом является *Methylobacterium extorquens*, который содержит фермент МДГ в доминирующем количестве. Семейство MxaF относится к наиболее распространенному типу фермента в окружающей среде, поэтому изучение его стабильности при хранении является актуальной задачей.

Следовательно, целью работы является определение влияния условий хранения на стабильность фермента метанолдегидрогеназы (МДГ) MxaF-типа.

В качестве материала для выделения белка использовали биомассу бактерий *M. extorquens* РСМ160, выращенную на среде Канада. Для определения активности фермента МДГ использовали спектрофотометрический метод по известной методике (Day,1990). Определение концентрации белка проводили по методу Бредфорда (Kirchhoff, 2006). Выделение фермента МДГ проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, основанной на образовании прочной связи белка с полигистидиновой меткой с комплексом никеля.

Как известно из литературных данных, МДГ сохраняет свою активность при хранении -70°С (незначительная потеря активности через 6 месяцев), -20°С и +4°С (потеря 80% активности в течении 1 недели) (Olson, 2016).

Для изучения стабильности МДГ при различных условиях хранения подготовили 4 образца МДГ, выделенных из *M. extorquens* РСМ160. Анализируемые образцы хранили в микропробирках при +4°С и -20°С, в разных буферных растворах. Первым буферным раствором был элюирующий буфер, содержащий 100 мМ имидазола, 20 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, рН=8. Вторым буферным раствором содержал 20 мМ Tris-HCl, рН=7. Перед проведением анализа замороженные образцы размораживали в ледяной бане, с контролем температуры +4°С. Эксперимент проводили по стандартной методике опреде-

ления активности фермента МДГ спектрофотометрическим методом. Результаты приведены в таблицах 1,2 и на рисунке 1.

Таблица 1.

Стабильность фермента МДГ при +4°С и -20°С, в элюирующем буфере (100 мМ имидазола, 20 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, рН=8)

Время хранения, сутки	Удельная активность при температуре хранения, Ед/мг белка	
	+4°С	-20°С
1	0,103	0,102
3	0,100	0,001
7	0,099	0
15	0,098	0
25	0,014	0
30	0,007	0
37	Не измерялось	Не измерялось

Таблица 2.

Стабильность фермента МДГ при +4°С и -20°С, в буфере состоящего из 20 мМ Tris-HCl, рН=7

Время хранения, сутки	Удельная активность при температуре хранения, Ед/мг белка	
	+4°С	-20°С
1	0,103	0,102
3	0,100	0,101
7	0,099	0,100
15	0,098	0,099
25	0,092	0,098
30	0,090	0,096
37	Не измерялось	Не измерялось

По получившимся результатам, представленным в таблицах 1 и 2, можно сделать вывод, что удельная активность образца, хранившегося при +4°С, в элюирующем буфере снизилась на 5% на пятнадцатые сутки, в течение месяца на 93%. При -20°С, активность МДГ снизилась на 99% на третьи сутки. Данный вид хранения МДГ не позволяет ис-

¹³ Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

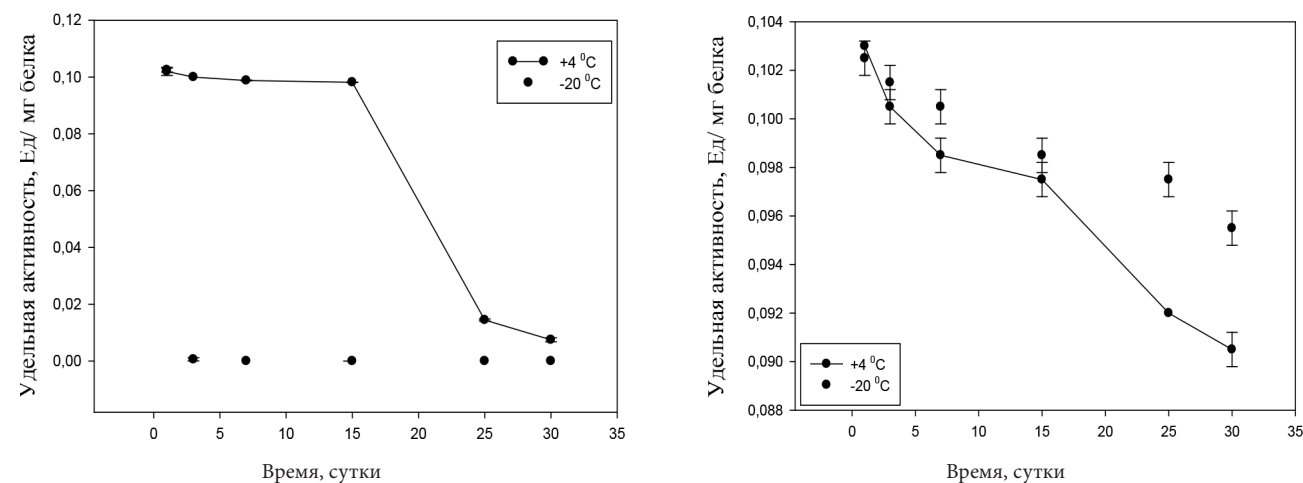


Рисунок 1. Слева: стабильность фермента МДГ при +4°C и -20°C, в элюирующем буфере (100 мМ имидазола, 20 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, pH=8); справа: стабильность фермента МДГ при +4°C и -20°C, в буфере состоящего из 20 мМ Tris-HCl, pH=7

пользовать биоматериал при анализе в долгосрочной перспективе. Концентрация NaCl (0,5 М) очень велика, для хранения фермента, в результате чего белок денатурирует.

Активность биоматериала, хранившегося при +4°C, в буфере 20 мМ Tris-HCl при pH=7, через месяц снизилась на 13 %. При -20°C, активность МДГ снизилась на 6% через месяц, что позволяет использовать данный биоматериал при дальнейших измерениях.

Таким образом, чтобы сохранить каталитическую активность фермента необходимо соблюдать условия хранения в определенных буферных системах при минусовых (-20°C или ниже) и плюсовых (+4°C) температурах.

Список литературы:

1. Day D.J. Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 / D.J. Day and C. Anthony // *Methods Enzymol* – 1990. – V. 188. – P. 210–216.
2. Kirchhoff, J.R.; Faehnle, C.R.; Viola, R.E.; Hudson, R.A. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* // *Protein Expr. Purif.* – 2006. – V. 46. – P. 316–320.
3. Olson, B.J.S.C. Assays for Determination of Protein Concentration // *Curr Protoc Pharmacols.* – 2016. – P.73.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *COELASTRELLA*

Д.А. Бахарева¹⁴, Т.А. Федоренко¹⁵, К.А. Шибзухова¹⁶,
П.А. Зайцев¹⁷, А.А. Зайцева¹⁸

Микроводоросли отдела Chlorophyta широко используются в биотехнологии как продуценты ценных веществ, таких как каротиноиды. Данные вещества обладают антиоксидантной активностью и применяются как пищевые добавки в животноводстве, используются в лечении ряда заболеваний, а также имеют ценность для косметической промышленности. Особенностью микроводорослей рода *Coelastrella* является способность накапливать одновременно два промышленно значимых каротиноида: астаксантин и β-каротин. Цель данной работы – сравнительный анализ биотехнологического потенциала микроводорослей рода *Coelastrella* (штаммы *Coelastrella aeroterrestrica* HELL-2, *Coelastrella astaxanthina* K-1 и *Coelastrella rubescens* NAMSU R1).

Исследуемые штаммы были выделены из различных местообитаний в виде красного налета, затем были получены альгологически чистые культуры. Проведена идентификация изолятов при помощи анализа филогенетических деревьев, построенных на основании фрагментов ядерного рибосомального кластера генов, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) 1 и 2, а также ген 5,8S рРНК. Проведено морфологическое описание культур с использованием методов световой микроскопии и СЭМ (сканирующей электронной микроскопии). Индукцию вторичного каротиногенеза проводили в условиях комбинированного стресса: увеличение интенсивности освещения и дефицит азота в минеральной среде. Регистрировали кривую роста в условиях комбинированного стресса по сухому весу и содержанию хлорофиллов и каротиноидов. Анализ пигментного состава микроводорослей после индукции каротиногенеза проводили при помощи тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Исследуемые изоляты были отнесены к видам *Coelastrella aeroterrestrica* Tschaike, Gärtner & Kofler, *Coelastrella astaxanthina* Ohkoshi, Yoshida & Kawasaki и *Coelastrella*

¹⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹⁶ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹⁷ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹⁸ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

rubescens (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás при помощи молекулярных методов и морфологического анализа. После индукции вторичного каротиногенеза наблюдалось повышение содержания каротиноидов для всех исследуемых штаммов, максимум содержания каротиноидов наблюдался у штамма *C. astaxanthina* и составил 22,5 мг/мл на 4-е сутки культивирования. Пигментный анализ показал, что все исследуемые штаммы накапливают β-каротин, астаксантин и эхиненон, кроме того, штаммы *C. astaxanthina* и *C. aeroterrestrica* также накапливают адонирубин, и *C. astaxanthina* и *C. rubescens* – α-каротин. Таким образом, наиболее перспективным штаммом для дальнейших исследований является *C. astaxanthina*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 20-74-10028)

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА ГОМЕОСТАЗ ЦИСТЕИНА У *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

К.В. Безматерных¹⁹, А.В. Тюленев²⁰, Т.В. Калашникова²¹,
В.Ю. Ушаков²², О.Н. Октябрьский²³, Г.В. Смирнова²⁴

В клетках живых организмов L-цистеин является компонентом различных белков и глутатиона (GSH), а также служит источником восстановленной серы для многих других органических молекул. SH-группы, входящие в состав цистеина, обладают высокой редокс-активностью, что определяет их важную роль в регуляции активности ферментов, редокс-сигналикации и других метаболических процессах. Вместе с тем, высокая редокс-активность цистеина делает его потенциально опасным из-за способности восстанавливать внутриклеточные ионы Fe³⁺ до Fe²⁺, тем самым ускоряя реакцию Фентона в присутствии H₂O₂. Гидроксильный радикал, образующийся в результате этой реакции, чрезвычайно токсичен и может повреждать все биологические молекулы. Для того, чтобы предотвратить эти нежелательные эффекты, клетки поддерживают свободный внутриклеточный цистеин на низком уровне (0.1 – 0.2 mM) и обладают механизмами, обеспечивающими его гомеостаз. Ранее мы обнаружили, что резкое ингибирование синтеза белка при обработке хлорамфениколом (ХФ) клеток *E. coli*, растущих на минимальной среде с глюкозой, приводит к временному нарушению гомеостаза цистеина. Возникающие при этом излишки цистеина экспортируются из клеток в среду, встраиваются в GSH и частично разрушаются с образованием H₂S. При росте *E. coli* на среде M9 единственным источником серы является сульфат (SO₄²⁻), транспорт и метаболизм которого регулируется с участием транскрипционного активатора CysB. H₂S выступает в качестве антииндуктора CysB. Присутствие цистеина или цистина в среде приводит к почти полному прекращению собственного синтеза цистеина за счет ингибирования активности серинтрансацетилазы. Целью данного исследования было выяснение механизмов поддержания гомеостаза цистеина при ингибировании синтеза

¹⁹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²⁰ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия
Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²³ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²⁴ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

белка хлорамфениколом в условиях, когда среда не содержит сульфата и основным источником серы является цистин.

Объектом исследований служили штаммы *E. coli* из коллекции Keio: родитель BW25113 (wt) и мутант JW2663 (*ΔgshA*), лишенный глутатиона. Использовали 3 варианта среды: 1) среда 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%); 2) среда M9 без сульфата (MgSO_4 заменяли на MgCl_2) с глюкозой (0.2%) и казаминовыми кислотами (CA) (0.2%); 3) среда LB. Ночную культуру разбавляли в 80 мл среды до начальной OD_{600} около 0.03 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37°, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили хлорамфеникол (25 мкг/мл) и продолжали инкубацию в течение двух часов. Периодически, с интервалом 15-30 минут, отбирали пробы для определения OD_{600} , цистеина и глутатиона. Цистеин определяли по методу Gaitonde. Глутатион измеряли циклическим методом Tietze, используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу. Продукцию сульфида контролировали непосредственно в колбах с помощью системы сульфид специфического ионоселективного халькогенидного электрода XC-S2-001 (рабочий диапазон pH 6–12) («Сенсорные системы», Россия), сравнительного электрода и компьютерного pH/иономера срХ-2 (ИБП Пущино, Россия). H_2S в газовой фазе определяли по изменению окраски бумажных полосок, пропитанных ацетатом свинца и зафиксированных над поверхностью культуральной среды. Окрашенные полоски фотографировали и фотографии обрабатывали, используя программу ImageJ.

Удельная скорость роста родительского штамма в момент добавления ХФ равнялась 0.65 ± 0.01 , 1.1 ± 0.01 и 1.3 ± 0.01 час⁻¹ для 1, 2 и 3 варианта сред соответственно. Соответствующие значения для мутанта *gshA* составляли 0.7 ± 0.01 , 1.2 ± 0.03 и 1.5 ± 0.04 час⁻¹. Добавление ХФ вызывало быстрое ингибирование роста в обоих штаммах и через 1 час экспозиции скорость роста была около 0.1 час⁻¹.

Среда M9 с СА содержала 25 μM цистина, среда LB – 60 μM цистина и 11 μM GSH. При выращивании бактерий на среде M9 без добавок внутриклеточная концентрация цистеина для родителя и *gshA* мутанта составляла 0.13 ± 0.02 μM/ OD_{600} и не изменялась в процессе культивирования. Обработка ХФ не оказывала существенного влияния на внутриклеточную концентрацию цистеина у родителя, но в 2.9 раз повышала уровень цистеина в клетках *gshA* мутанта. В этих условиях ХФ стимулировал выход цистеина из клеток обоих штаммов, в 3 раза увеличивая концентрацию цистеина в среде. При росте на среде LB внутриклеточная концентрация цистеина для обоих штаммов постепенно снижалась по мере культивирования с 0.50 ± 0.03 до 0.29 ± 0.04 μM/ OD_{600} для родителя и с 0.48 ± 0.03 до 0.28 ± 0.04 μM/ OD_{600} для *gshA* мутанта. Добавление ХФ не вызывало изменения концентрации внутриклеточного цистеина у родителя, но в 2.9 раза повышало уровень цистеина в клетках *gshA* мутанта.

Уровень внутриклеточного GSH (GSH_{in}) при росте *E. coli* BW25113 на среде M9 без добавок линейно изменялся в течение 2 часов с 6.2 ± 0.25 до 8.6 ± 0.35 μM/ OD_{600} . До-

бавление ХФ вызывало быстрое повышение GSH_{in}, которое через 1 час после обработки в 2 раза превышало исходный уровень. Наблюдался быстрый выход GSH из клеток в среду, где его концентрация (GSH_{out}) изменялась с 1.2 ± 0.05 до 21 ± 1.3 μM/ OD_{600} . На среде M9 без сульфата, но с СА, GSH_{in} в контроле поддерживался на уровне 5 μM/ OD_{600} . Добавление ХФ увеличивало этот уровень в 1.4 раза, при этом GSH_{out} возрастал в 4 раза по сравнению с контролем через 2 часа экспозиции к антибиотику. При росте *E. coli* BW25113 на среде LB GSH_{in} в контроле составлял 9.5 μM/ OD_{600} и не изменялся в процессе культивирования. ХФ вызывал возрастание GSH_{in} до 22.5 ± 1.2 μM/ OD_{600} , при этом концентрация GSH в среде увеличивалась в 2.3 раза (до 6.4 ± 0.3 μM/ OD_{600}). Таким образом, независимо от состава среды ХФ стимулировал синтез GSH, при этом в вариантах со средой M9 наблюдался интенсивный выход GSH из клеток. На среде LB преобладало накопление внутриклеточного GSH.

При росте на среде M9 без добавок не наблюдалось продукции сульфида как у родителя, так и у *gshA* мутанта. Добавление ХФ вызывало резкое обратимое падение потенциала сульфидного электрода, что свидетельствует о появлении сульфида в среде. Продолжительность продукции сульфида у родителя составляла 25 мин с максимумом через 7 мин после внесения ХФ. Для *gshA* мутанта эти параметры равнялись 60 мин и 12 мин соответственно. Одновременно фиксировалось возрастание концентрации H_2S в газовой фазе, которое было лучше выражено у *gshA* мутанта. При росте бактерий на среде M9 с СА, содержащей цистин, активная продукция сульфида начиналась сразу после внесения клеток в среду и продолжалась вплоть до исчерпания цистина. Добавление ХФ в фазе продукции сульфида не приводило к дальнейшему снижению потенциала сульфидного электрода у обоих штаммов, но продлевало период, в течение которого в газовой фазе фиксировался H_2S . Внесение ХФ в фазе исчерпания цистина не сопровождалось продукцией сульфида у родителя, но вызывало скачок потенциала у *gshA* мутанта. Аналогичная ситуация наблюдалась на среде LB.

Таким образом, резкое торможение роста *E. coli* в результате обработки ХФ вызывает появление временного избытка цистеина в клетках независимо от состава среды. Гомеостаз цистеина быстро восстанавливается в родительском штамме за счет встраивания цистеина в GSH. Присутствие GSH в среде LB затрудняет экспорт глутатиона из клеток. Присутствие цистина в среде само по себе стимулирует продукцию H_2S для поддержания гомеостаза цистеина в клетках. Добавление ХФ на этом фоне не приводит к усилению продукции H_2S .

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

НОВЫЕ ДАННЫЕ О СООБЩЕСТВЕ АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РЕЛИКТОВОГО ОЗЕРА МОГИЛЬНОЕ (ОСТРОВ КИЛЬДИН)

В. В. Беленкова²⁵, О. Н. Лунина²⁶, Д. С. Груздев²⁷, В. В. Козяева²⁸,
А. С. Саввичев²⁹, В. М. Горленко³⁰

Микробное сообщество аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) реликтового озера Могильного привлекает внимание ученых уже больше ста лет. Это мезотрофный меромиктический водоем с практически полным отсутствием циркуляции воды между слоями различной минерализации. В нем наблюдается устойчивая стратификация водных слоев от почти пресных на поверхности (соленость не более 5‰) до соленых на дне (соленость до 30‰). В озере выделяют три зоны: аэробную, анаэробную (с повышенным содержанием сероводорода) и переходную – хемоклин с оптимальными условиями для существования концентрированного микробного сообщества АФБ: балансом сероводорода и солнечного света, позволяющего наиболее эффективно окислять сероводород до серы. [1]

Первые исследования микроорганизмов бактериальной пластины озера Могильного были выполнены в начале 20-ого века Б.Л. Исаченко, который определил, что розовый цвет пластине придают пурпурные бактерии *Chromatium*. В 70-ых годах было установлено по морфо-физиологическим признакам, что доминирующим видом является *Chlorobium phaeovibrioides* – коричнево окрашенная зеленая серобактерия (ЗСБ). Субдоминантами были также коричнево окрашенные зеленые серобактерии *Pelodyctium phaeum* и *Prosthecochloris phaeoaeuarii* (впервые описан на озере Могильном). [2]

В июне 1999 г. и сентябре 2001 г. методом 16S рРНК было подтверждено, что *Chlorobium phaeovibrioides* – доминирующий вид, однако минорными видами, кроме *Pelodyctium phaeum* и *Prosthecochloris phaeoaeuarii*, оказались *Thiocapsa sp.*, *Thiocystis spp.* и *Thiorhodococcus sp.* [4] Последние масштабные экспедиции на озеро Могильное были предприняты в июле-августе и октябре 2018 года, а также в июне 2019 года. Их целью

было выяснить нынешнее состояние пресной воды и расположение зоны сероводорода. Сероводород в небольших количествах наблюдался уже на глубине 7,7 м., в верхнем пресном слое воды было отмечено засоление до 7,1‰. Также исследование пигментного состава микробного сообщества позволило определить, что доминантами являются коричнево окрашенные АФБ, но точный вид установить не удалось. [3, 5]

Цель исследования. Произвести оценку многообразия сообщества АФБ с помощью новейших молекулярных данных. В рамках цели поставлены следующие задачи: при помощи метагеномного секвенирования биомассы из зоны хемоклина определить видовой состав АФБ в микробном сообществе; получить культуры серобактерий из проб воды зоны хемоклина на селективной среде и провести их идентификацию со специфическими праймерами на ген 16S рРНК.

Основные методы. Для выделения и культивирования АФБ использовали среду Пфеннига. Филогенетический анализ выделенных культур проводили с использованием универсального праймера на ген, кодирующий 16S рРНК ЗСБ.

Проводили выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификацию и высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК.

Результаты. Гидрохимические исследования были выполнены в июле 2018 года в наиболее глубоком месте водоема (точка 69° 19.096' 34° 20.998'). Соленость в толще воды изменялась от 5,5‰ на поверхности до 29,5‰ на глубине 15,5м, при этом наблюдался резкий скачок на глубине 2–6 м: с 5,5‰ до 26,4‰. Слой розовой воды располагался на глубине 7,7–8,5 метра. Сероводород появлялся на глубине 8 метров, где было зарегистрировано максимальное содержание бактериохлорофилла е.

Исследования метагенома сообщества хемоклина показали, что в двух пробах, отобранных с глубины 7,8 и 8 метров, доминируют представители филума *Chlorobi* с преобладанием коричнево окрашенного морфотипа вида *Chlorobium phaeovibrioides* (81.2% и 73.4%). В геноме доминанта идентифицирована полная последовательность гена 16S рРНК с уровнем сходства в 99.93% с *Chlorobium phaeovibrioides* Mog4, микроорганизмом, ранее выделенным О.Н. Луниной из озера. В полученном геноме были идентифицированы гены *bciD* и *bchF3*, ответственные за биосинтез бактериохлорофилла е и каротиноида изорениератина, и генный кластер *gvp*, отвечающий за образование газовых везикул.

Посевы, произведенные нами в 2018–2019 годах, расширили список минорных видов, обитающих в озере Могильном. Были идентифицированы следующие виды АФБ: коричнево окрашенный и зелено окрашенный морфотипы ЗСБ *Prosthecochloris aestuarii*, а также зеленоокрашенный вид *Prosthecochloris indica*. В качестве минорных видов были выделены в культуру пурпурные бактерии *Thiocapsa rosea* и *Thiosystis sp.* Также были исследованы морфология, строение клеток и основные физиологические свойства выделенных культур АФБ.

Заключение. Выполненные нами исследования показали, что граница сероводородного слоя в озере Могильном осталась на уровне 8-9 метров. Незначительное засоление

²⁵ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁶ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁷ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁸ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

³⁰ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

миксолимниона не повлияло на видовой состав АФБ зоны хемоклина. В этой зоне формируется розовый слой воды с преобладанием бактерий вида *Chlorobium phaeovibrioides*, что подтвердилось нашими данными метагеномного анализа. Из выделенных монокультур ЗСБ впервые идентифицированы коричнево окрашенный (ранее названный *Prostecochloris phaeoasteroidea*) и зеленоокрашенный морфотипы *Prostecochloris aestuarii* и зеленоокрашенный вид *Prostecochloris indica*, что уточнило и расширило представление о биоразнообразии микробного сообщества реликтового озера Могильного.

Список литературы:

1. Беленкова В.В., Саввичев А.С. Микробиологические исследования на озере Могильном. Природа. 2021; 1267(3): 50–60.
2. Горленко В.М., Вайнштейн М.Б., Качалкин В.И. Микробиология озера Могильного. Микробиологические процессы. Реликтовое озеро Могильное. Ред. В.И. Гуревич, Р.Я.Цееб. Л., 1975; 188–197.
3. Жильцова А.А., Емельянцева П.С., Краснова Е.Д. и др. Определение доминирующих фотосинтезирующих организмов в хемоклине озера оз. Могильного (о. Кильдин, Баренцево море) и их вертикального распределения методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии // Труды VIII Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2019)» Том II (III): [сборник]. - Тверь, 2020; 428–432.
4. Лунина О.Н., Горленко В.М., Соловьева О.А. и др. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий реликтового озера Могильного (о.Кильдин, Баренцево море). Микробиология. 2005; 74(5): 677–686.
5. Krasnova E.D., Efimov V.A., Fedyuk M.L. et al. New data on lake Mogilnoe (Kildin island, Barents Sea): the results of the 2018 expeditions. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019; 263: 1–8.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ ВОЗМОЖНО ОТСЛЕЖИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ КРАСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХРОМОФОРА GFP

А.С. Белоусов³¹, И.В. Маслов³², П.А. Хорн³³, А.С. Мишин³⁴,
М.С. Баранов³⁵, А.В. Мишин³⁶, Е.Ю. Зерний³⁷,
С.Е. Пермяков³⁸, В.И. Борщевский³⁹

Рековерин представляет собой белок с массой 23 кДа, относящийся к суперсемейству EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков. Одной из функций рековерина является регулирование активности родопсинакиназы GRK1, регулирующей активность родопсина. При тусклом окружающем освещении уровень кальция в палочковидных клетках сетчатки высок, поэтому рековерин связывается с кальцием, высвобождает миристоиловую группу, прикрепляется к липидному бислою и ингибирует родопсин-киназу. Таким образом, рековерин сохраняет чувствительность родопсина к фотонам, и позволяет глазу обнаруживать визуальные сигналы даже в условиях низкой освещенности. Высвобождение миристоиловой группы при активации значительно изменяет конформацию белка, что позволяет проводить эксперименты с отслеживанием конформации рековерина. Многие биофизические методы ранее использовались для изучения конформационной динамики рековерина, включая ЯМР, поверхностный плазмонный резонанс и флуоресцентную спектроскопию. В данной работе мы описываем флуоресцентные сольватохромные красители, пригодные для спектроскопического наблюдения конформационных изменений рековерина.

Мы изучили четыре красителя на основе хромофорного ядра GFP, которые присоединяются к единственному цистеину в 39-м положении с помощью малеимид-тиолового взаимодействия. Мы подтвердили связывание красителя с рековерином, проверили специфичность покраски, а затем два из четырех образцов показали изменения в фотофизических свойствах (спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции) при добавлении CaCl_2 к неактивному и EGTA к активному белку.

³¹ Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³² Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³³ Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³⁵ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³⁶ Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³⁷ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Москва, Россия

³⁸ Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия

³⁹ Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

Один из четырех красителей был успешно использован для отслеживания конформационных изменений в рецепторах, сопряженных с G-белком, индуцированных различными лигандами.

Наши эксперименты подтвердили сольватохромные свойства исследованных флуоресцентных красителей и показали, что они могут быть успешно использованы для спектроскопического наблюдения конформационной динамики в белках.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение # 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).

МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО НЕФТЯНЫХ СКВАЖИН РОМАШКИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

Л.Р. Бикташева⁴⁰, А.С. Гордеев⁴¹

Микроорганизмы в нефтяных пластах бывают автохтонными и аллохтонными, внесенные с нагнетательной водой. Эти микроорганизмы включают несколько многочисленных групп бактерий и архей, таких как метаногены, ферментативные бактерии, сульфатные, железо-, марганцевые и нитратредуценты [1,2]. Известно, доля извлекаемой сырой нефти обычно ниже для месторождений с тяжелыми нефтями, смола и сложными углеводородами. В настоящее время существует множество методов увеличения нефтедобычи, одним из которых являются микробные методы (ММУН), характеризующиеся высокой эффективностью, дешевизной и отсутствием негативного воздействия на окружающую среду [3]. ММУН может включать как стимуляцию местной микрофлоры нефтяной скважины (методы *in situ*), так и закачку экзогенных микробных клеток и/или микробных продуктов в скважину (методы *ex situ*). Оценка потенциала аборигенной микрофлоры до выбора и использования этого типа ММУН имеет большое практическое значение. Нефтяные месторождения различаются по многим характеристикам, начиная от расположения нефтяных скважин, заканчивая характеристиками нефти и заканчивая особенностями скважин. Несмотря на множество статей, опубликованных по экосистемам нефтяных месторождений, недостаточно данных о структурах и функционировании микробных сообществ в конкретных сырых нефтях или нефтяных месторождениях и скважинах. Одним из таких является Ромашкинское месторождение, расположенное в Татарстане (Россия). Целью данного исследования стала оценка бактериального сообщества сырой нефти четырех скважин Ромашкинского месторождения.

В ходе работы в образцах сырой нефти скважин 14829, 32381/1, 20820, 32383/2 была проведена экстракция ДНК. Экстракция ДНК проводилась с помощью концентрирования образцов объемом 5 л буфером Виноградского. Метод экстракции с буфером Виноградского (0.25 г/л K_2HPO_4 , 0.25 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.125 г/л NaCl, 2.5 мг/л $Fe_2(SO_4) \cdot 3H_2O$, 2.5 мг/л $MnSO_4 \cdot 4H_2O$) заключался в смешивании образцов сырой нефти с равным объемом буфера Виноградского. Смесь инкубировали в течение 10 минут при 80°C. Водную фазу собирали стерильной пипеткой. Процедуру повторяли пять раз, до достижения общего объема экстракта. Собранный экстракт осаждали центрифуги-

⁴⁰ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁴¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

рованием при $12000 \times g$ в течение 20 минут при 4°C , а водную фазу осаждали на мембранных фильтрах (0,22 мкм). Геномная ДНК была экстрагирована как из осадков, так и из мембранных фильтров с помощью набора FastDNA kit for soil (Bio101, Qiogene, Германия).

На следующем этапе проводили культивирование микроорганизмов сырой нефти, так называемое обогащение. Культивирование микроорганизмов проводили в емкостях на 500 мл в анаэробных условиях, время культивирования составляло 14 суток. В емкостях на 500 мл была подготовлено 400 мл солевой среды (однозамещенный фосфат калия 3 г/л, сульфат магния семи водный 0,2 г/л, двух замещенный фосфат натрия 4,5 г/л, сульфат аммония 1 г/л), из которой с помощью барботирования азотом был вытеснен кислород, затем среда была простерилизована с помощью автоклава при температуре 121°C и давлении 1,1 атм. Добавки сульфата и нитрата натрия, а также ацетат натрия были подготовлены аналогичным образом. Среда для культивирования представляла собой микроэлементы (солевая среда), с добавлением сульфата натрия (10 мМ) и нитрата натрия (10 мМ), для ускорения развития микроорганизмов добавляли ацетат натрия (10 мМ). Добавки добавляли стерильными шприцами, из которых предварительно вытесняли кислород с помощью продувания азотом. Образцы нефти добавляли в емкости в объеме 2%, в анаэробных условиях. Культивирование микроорганизмов проводили в анаэроостате в анаэробных условиях в течение 14 суток. Водную и масляную фазу культуральной жидкости разделяли с помощью стерильной делительной воронки. Нуклеиновые кислоты из водной фазы осаждали на мембранных фильтрах (0,22 мкм), масляную фазу – концентрацией Виноградского, как описано ранее. Полученные экстракты ДНК были далее экстрагированы как описано ранее.

Анализ структуры микробного сообщества проводили с помощью секвенирования на базе платформы Illumina MiSeq (Illumina, США). Подготовка геномной библиотеки была осуществлена согласно модифицированному протоколу Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Illumina, США). Данные секвенирования 16S рРНК были проанализированы с помощью программного обеспечения Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) platform, version 1.6.0. Выравнивание репрезентативных последовательностей проводили согласно алгоритму PyNAST. Таксономическая структура была определена в сравнении с базой данных Greengenes с использованием программы USEARCH. Операционные таксономические единицы были сгруппированы с порогом сходства 97%.

Прямая экстракция образцов не позволила получить необходимое для анализа количество ДНК. В связи с чем проводили предварительное анаэробное культивирование (обогащение) и последующий анализ микробиома нефтяных образцов.

В результате секвенирования, что наиболее простой микробный состав наблюдался в образце 20820, не содержащем воды, а наиболее разнообразный – в образце 14829, содержащем высокие доли нефти и тяжелой водонефтяной эмульсии, а также воды. *Pseudomonadaceae* доминировал во всех четырех пробах, в пробах 20820 и 32381/1 сам

по себе, а в пробах 14829 и 32383/2 – вместе с *Dietzeae* и *Micrococaceae*. В исследованных нефтяных пластах не обнаружено хорошо известных бактерий со специфическими сульфатредуцирующими путями метаболизма, таких как *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*.

Возможные функциональные характеристики микробных сообществ прогнозировали с помощью программного обеспечения iVikodak на основе базы данных KEGG. На основе связи между филогенезом и функцией был сделан прогноз потенциальной функциональной активности сообщества с использованием данных 16S рРНК. В образце 14829 и 32381/1 осуществлялся путь метаболизма крахмала и сахарозы, тогда как для остальных образцов он не был характерен. Эти образцы также характеризовались наименьшим для функционального потенциала. Тогда как остальные изучаемые сообщества (20820 и 32383/2) в основном осуществляли пути фиксации углерода, гликолиза/глюконеогенеза, цитратный цикл и деградацию бензоата и так далее. Прогнозируемые профили ферментов метаболизма метана, метаболизм серы и пути метаболизма азота в образцах добывающих скважин 20820 и 32383/2 показывают более высокую потенциальную активность по сравнению со скважинами 14829 и 32381/1. Наименьшим видовым разнообразием обладают образцы 20820 и 32381/1 с индексами альфа разнообразия Шеннона-Уивера равными 0.257 и 0.726, а наивысшим – образец 14829 (2.634). Можно отметить, что несмотря на высокое видовое разнообразие в образце 14829, он характеризовался наименьшим функциональным потенциалом.

Таким образом, в ходе работы был проведен анализ микробного сообщества в четырех образцах нефти Ромашкинского месторождения с помощью метода обогащения образцов, и последующего секвенирования.

Список литературы:

1. Sierra-Garcia I.N., Belgini D.R.B., Torres-Ballesteros A., Paez-Espino D., Capilla R., Santos Neto E. V., Gray N., de Oliveira V.M. In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. // Sci. Total Environ. – 2020. – Vol. 715. – P. 136646.
2. Korenblum E., Souza D.B., Penna M., Seldin L. Molecular Analysis of the Bacterial Communities in Crude Oil Samples from Two Brazilian Offshore Petroleum Platforms // Int. J. Microbiol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–8.
3. Dellagnezze B.M., Vasconcellos S.P., Angelim A.L., Melo V.M.M., Santisi S., Cappello S., Oliveira V.M. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale // Mar. Pollut. Bull. – 2016. – Vol. 107, no. 1. – P. 107–117.

ЦИАНОБАКТЕРИИ КАК ИСТОЧНИК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОВОДОРОДА

**А.М. Бозиева⁴², М.Х. Хасимов⁴³, Р.А. Волошин⁴⁴, М.А. Синетова⁴⁵,
Е.В. Куприянова⁴⁶, С.К. Жармухамедов⁴⁷, С.И. Аллахвердиев⁴⁸**

Рост населения мира, увеличение спроса на энергию и истощение запасов ископаемого топлива оказывают давление на потребление невозобновляемых источников энергии. Эти актуальные проблемы современности, будучи взаимосвязанными с выбросами ископаемого CO₂ (в результате сжигания ископаемого топлива), и глобальными изменениями климата, являются мощным стимулом к поиску альтернативных источников энергии [1]. Новые источники энергии должны быть возобновляемыми и экологически чистыми. Этим требованиям отвечает биоводород, то есть молекулярный водород, полученный биологическим или фотобиологическим путем [2]. Биоводород рассматривается как наиболее предпочтительный кандидат на роль альтернативного энергоносителя, так как его производство основано на неисчерпаемых ресурсах – солнечной энергии и воде. Отдельным достоинством биоводорода является то, что побочным продуктом его сгорания является вода – экологически нейтральное соединение [3-5].

В данной работе исследована способность к выделению водорода ранее неизученными штаммами цианобактерий: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 из коллекции цианобактерий и микроводорослей IPPAS ИФР РАН. Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L выбран в качестве положительного контроля [6, 7]. Для получения водорода штаммы цианобактерий культивировали в фотобиореакторе при искусственном освещении 100–110 моль м⁻² с⁻¹ в условиях оптимальной температуры для каждого штамма. В период роста культуры продувались воздушной смесью с концентрацией CO₂ до 1,5%. На следующем этапе культуры дважды промывали соответствующей свежей питательной средой, концентрировали до оптической плотности – 1,5–2,5 (при 750 нм) и переносили в 50 мл бутылки герметично закрывающиеся резиновыми

пробками. Анаэробные условия были созданы путем продувки культур аргоном (99,999%) в течении 10/20 минут, для ингибирования фотосинтетической активности использовали диурон. После продувки культуры переносились на биошейкер (IKA KS 4000 I control, Russia). Отбор проб проводили каждые 24 часа в течении 4-х суток. Концентрацию выделившегося водорода измеряли на газовом хроматографе (ГХ «Экохром», Россия). Согласно результатам, в темновых анаэробных условиях продуцировать биоводород способны штаммы *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 и *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L, а в условиях искусственного освещения – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. В ходе экспериментов для исследуемых штаммов получены следующие максимальные значения скорости выделения водорода: для контрольного штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L – 0,72 мкмоль H₂(мг Хл*ч)⁻¹ (через 24 часа темновой инкубации в присутствии 20 мкМ DCMU); *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 – 0,45 мкмоль H₂(мг Хл*ч)⁻¹ (через 24 часа темновой инкубации в присутствии 30 мкМ DCMU); *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 – 4,24 мкмоль H₂(мг Хл*ч)⁻¹ (через 24 часа инкубации на свету в присутствии 20 мкМ DCMU). Полученные значения соотносятся с литературными данными для других штаммов цианобактерий [8] и свидетельствуют о необходимости и перспективности дальнейших исследований в данном направлении.

Результаты получены в рамках государственного задания Минобрнауки и высшего образования Российской Федерации (121033000136-14) и при поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00118).

Список литературы:

1. Muradov NZ and Veziroğlu NT. “Green” path from fossil-based to hydrogen economy: An overview of carbon-neutral technologies. *Int J Hydrog Energy* 2008;33:6804–39.
2. Tsygankov AA. Biological generation of hydrogen. *Russ J Gen Chem* 2007;77:685–93.
3. Elam CC, Gregoire Padro CE, Sandrock G, Luzzi A, Lindblad P, Fjermstad-Hagen E. Realizing the hydrogen future, the International Energy Agency’s effort to advance hydrogen energy technologies. *Int J Hydrog Energy* 2003;28:601–7.
4. Antal TK, Matorin DN, Kukarskikh GP, Lambreva MD, Tyystjarvi E, Krendeleva TE, Tsygankov AA, Rubin AB. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. *Int J Hydrog Energy* 2014;39:18194–203.
5. Antal TK and Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J Appl Microbiol* 2015;98:114–20.
6. Kossalbayev BD, Tomo T, Zayadan BZ, Sadvakasova AK, Bolatkhan K, Alwasel S, Allakhverdiev SI. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 2020;45(4):2627–2639.

⁴² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. E-mail: ayshat2696@mail.ru

⁴³ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2

⁴⁴ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

⁴⁵ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

⁴⁶ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

⁴⁷ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2

⁴⁸ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2

7. Chongsuksantikul A, Asami K, Yoshikawa S, Ohtaguchi K. Hydrogen production by anaerobic dark metabolism in *Synechocystis sp.* strain PCC 6803-GT: effect of monosaccharide in nitrate free solution. J Biochem Tech 2014;5(3):735–42.

8. Allahverdiyeva Y, Leino H, Saari L, Fewer DP, Shunmugam S, Sivonen K, Aro E-M. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. Int J Hydrog Energy 2010;35:1117-1127.

**РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ИМПОРТА
В ВОЗРАСТНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ
И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ БОЛЕЗНЯХ**

**Д.С. Буркатовский⁴⁹, А.О. Богородский⁵⁰, И.С. Охрименко⁵¹,
И.В. Маслов⁵², В.И. Борщевский⁵³**

Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом цикле клетки, поддержании метаболизма и регуляции апоптоза. Эти функции в митохондриях поддерживаются благодаря более 1500 белков, находящихся на внутренней и внешней мембране, а также кристах и матриксе. Подавляющее большинство этих белков кодируется в ядре и продуцируется вне митохондрии. Для их сортировки по компартментам в митохондрии существует обширная белковая машинерия. Дефекты в этой машинерии связывают с широким кругом патологий, в особенности затрагивающих энергетически требовательные ткани.

В докладе дан обзор современных знаний о митохондриальной транспортной машинерии, в том числе в контексте её связи с рядом нейродегенеративных и возрастных болезней. Затронуты механизмы нарушения митохондриального транспорта при развитии болезни Паркинсона и Альцгеймера. В контексте нарушений митохондриального транспорта, связанного с сердечно-сосудистыми заболеваниями, разобрана роль TERT–обратной транскриптазы теломеразы.

Работа поддержана грантом РФФИ (№:20-54-12010).

⁴⁹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁵⁰ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁵¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁵² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁵³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

ИССЛЕДОВАНИЯ EX VIVO СТРУКТУРЫ ПРИОННОГО БЕЛКА SUP35 ИЗ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE МЕТОДОМ КРИО-ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.Д. Бурцева⁵⁴, Т.Н. Баймухаметов⁵⁵, А.А. Дергалева⁵⁶, К.М. Бойко⁵⁷

Прионы являются инфекционным подмножеством амилоидов - фибриллярных белковых агрегатов, образующих характерную кросс-β-структуру. Прионные белки способны катализировать конформационное превращение нормального клеточного белка в амилоидные структуры. Как известно, образование амилоидов является причиной возникновения ряда нейродегенеративных заболеваний человека, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона. Единственный прионный белок млекопитающих PrP имеет схожий механизм укладки и агрегации с белком дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Sup35 [1]. Это делает Sup35 модельным объектом для изучения образования амилоидов и прионной передачи конформации белка, благодаря удобству культивирования дрожжей и высокой скорости роста. Конформационное разнообразие амилоидных структур лежит в основе существования штаммовых вариантов прионной формы белка Sup35, которые делят на две условные категории: сильные (S) и слабые (W) [2]. Сильные варианты более эффективно связывают нормальную форму Sup35 в амилоидную фибриллу, а слабые полимеризует Sup35 менее эффективно.

На данный момент пространственная структура белка Sup35 не установлена, а существующие модели – противоречивы [3]. Исследования также показывают, что данные, полученные *in vitro* и *ex vivo*, значительно отличаются. Это может быть объяснено тем, что *in vitro* Sup35 самодостаточен для амилоидного превращения, однако в клетках дрожжей поддержание прионной формы белка требует действия специфического шаперона Hsp104, который участвует в его фрагментации. Исследования пространственного строения фибриллярных объектов классическими методами структурной биологии, такими как рентгеноструктурный анализ (РСА) или спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), затруднены в связи со специфической структурой амилоидных фибрилл. В то же время метод просвечивающей крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) позволяет исследовать амилоидные фибриллы с высоким уровнем детализации [4].

⁵⁴ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

⁵⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

⁵⁶ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

⁵⁷ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Данная работа посвящена исследованию пространственного строения прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, методом крио-ЭМ. В рамках работы были проведены эксперименты по негативному контрастированию вариантов W и S белка Sup35 с использованием ПЭМ Jeol-1200 (JEOL Ltd., Япония) (ЦКП Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова). Получена реконструкция фибриллы варианта W с низким разрешением, демонстрирующая характерные признаки спиральной структуры, а также оценены диаметр фибриллы (~100 Å) и шаг ее спирали (~250 Å), которые совпали в пределах погрешности с результатами, полученными альтернативными методами.

На установке для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при стандартных условиях были подготовлены образцы варианта W Sup35 для последующей крио-ЭМ. Экспериментальные данные были получены с использованием просвечивающего крио-электронного микроскопа Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США) (Ресурсный центр зондовой и электронной микроскопии «Нанозонд» НИЦ «Курчатовский институт»). Анализ полученных изображений свидетельствует о наличии вокруг амилоидных фибрилл плотной «шубы», образованной молекулами GFP (Рис. 1), ковалентно пришитыми к Sup35 для упрощения выделения и визуализации.

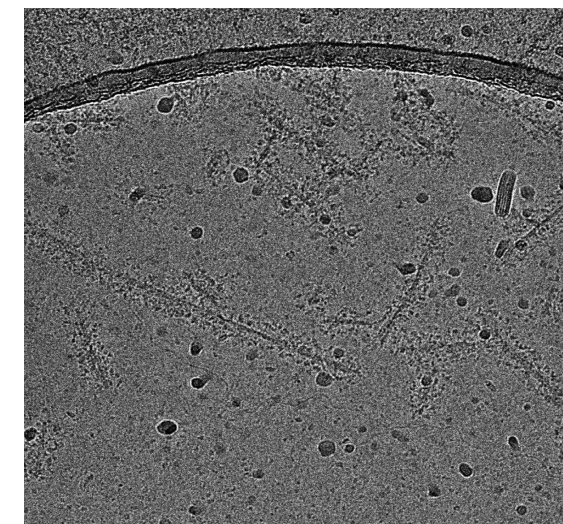


Рис.1. Изображение амилоидных фибрилл Sup 35 с «шубой» из GFP

2D классификация проекций амилоидных сегментов выявила несколько двумерных классов с характерными очертаниями фибриллярной структуры (Рис. 2), однако наличие GFP, очевидно, мешает реконструкции структуры с высоким разрешением. В настоящее время ведется работа по получению препаратов с отщепляемым GFP для дальнейших структурных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации – грант № 075-15-2021-1354.

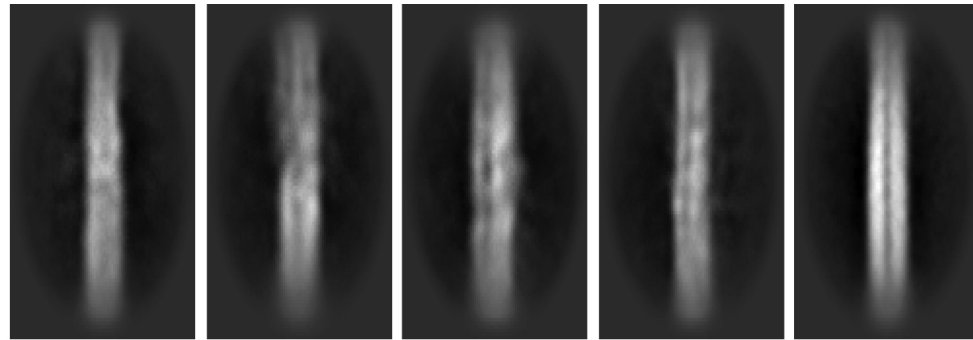


Рис.2. Изображение двумерных классов проекций амилоидных сегментов

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРА НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

А.А. Бычкова⁵⁸, Ю.В. Зайцева⁵⁹

Биопленки представляют собой особую форму существования микробных сообществ, зафиксированных на различных абиотических и биотических поверхностях. Они состоят из микробных клеток, погруженных во внеклеточный матрикс. Образование биопленок повышает устойчивость бактерий к неблагоприятным условиям среды, как например, дефицит питательных веществ, воздействие антибиотиков, ПАВ и др. Прикрепление микроорганизмов к поверхности субстрата в настоящее время рассматривается как важный фактор во время конкуренции за источники углерода и микроэлементы. В данной работе мы исследовали влияние различных концентраций фосфора на процесс образования биопленок фосфатмобилизирующими штаммами бактерий *Pseudomonas chlororaphis* GPR225 и *Pseudomonas* sp. GEOT21.

Штаммы культивировали в жидкой среде Пиковской, в качестве источника фосфора использовали K_2HPO_4 в концентрациях 0 мкг/мл, 700 мкг/мл, 900 мкг/мл, 1500 мкг/мл, 3000 мкг/мл, 5000 мкг/мл. В лунки 96-луночного планшета вносили по 200 мкл инокулированной бактериальной культурой среды Пиковской с добавлением определенной концентрации фосфора. В качестве негативного контроля использовали неинокулированную бактериями среду Пиковской, содержащую 500 мкг/мл K_2HPO_4 . Культивирование осуществляли при 28 °C в течение 48 часов при непрерывном перемешивании. Оценку уровня образования биопленок осуществляли по стандартной методике с использованием 0,1% раствора кристаллического фиолетового [1]. Оптическую плотность измеряли при 595 нм с использованием спектрофотометра Unicо 2100. Оптическую плотность планктонных клеток измеряли при длине волны 620 нм.

Установлено, что с увеличением концентрации свободного фосфора в среде культивирования наблюдается рост оптической плотности бактериальной суспензии обоих штаммов, максимальные значения OD_{620} регистрировались при концентрации в среде K_2HPO_4 равной 5000 мкг/мл (Рис.1). Уровень образования биопленок двумя штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, напротив, снижался с увеличением концентрации K_2HPO_4 от 700 мкг/мл до 5000 мкг/мл. Максимальный уровень образования биопленок наблюдался при 700 мкг/мл для штамма *Pseudomonas* sp. GEOT21 и при 900 мкг/мл. для штам-

⁵⁸ ФГБОУ ВО Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

⁵⁹ ФГБОУ ВО Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

ма *Pseudomonas chlororaphis* GPR225 (Рис.2). В варианте опыта без добавления K_2HPO_4 также наблюдался ярко выраженный процесс биопленкообразования, что может быть связано с наличием следовых количеств фосфора в среде выращивания суточной культуры, используемой для инокуляции среды Пиковской.

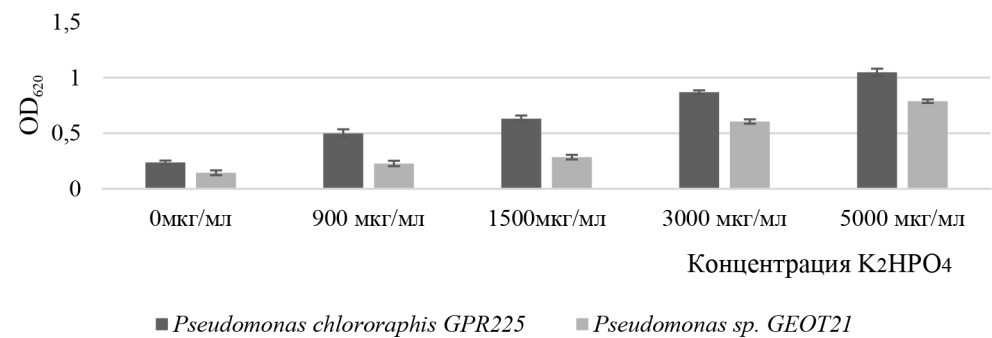


Рис. 1. Планктонный рост штаммов *Pseudomonas chlororaphis* GPR225 и *Pseudomonas sp. GEOT21* при различном содержании доступного фосфора в среде культивирования

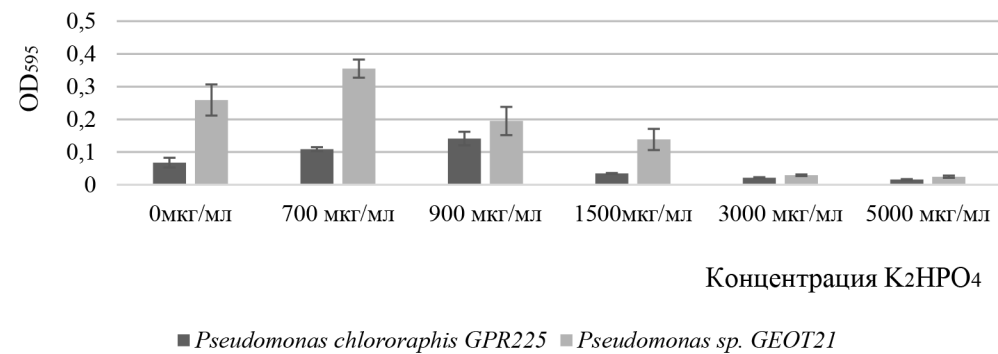


Рис. 2. Уровень образования биопленок бактериальными штаммами *Pseudomonas chlororaphis* GPR225 и *Pseudomonas sp. GEOT21* при различном содержании доступного фосфора в среде культивирования

Полученные результаты демонстрируют отрицательную корреляцию между концентрацией доступного фосфора и интенсивностью образования бактериальных биопленок. При недостатке фосфора наблюдалась стимуляция процесса биопленкообразования у обоих штаммов псевдомонад. Вероятно, исследуемые бактериальные культуры формируют биопленки в процессе фосфатмобилизации. Это позволяет бактериям эффективнее образовывать органические кислоты и, соответственно, растворять неорганические фосфаты. Ранее сходные данные были получены при исследовании штаммов *Burkholderia tropica* и *B. unatae*, также обладающих фосфатмобилизирующей активностью [2]. Мы предполагаем, что недостаток фосфора в среде культивирования индуцирует образование биопленок фосфатмобилизирующими штаммами бактерий рода *Pseudomonas*.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития ЯрГУ, НИР П2-ГЛ3-2022 «Молекулярно-генетические исследования, оценка физиолого-биохимического статуса и биотехнологического потенциала живых систем».

Список литературы:

1. Adetunji, V. O., Isola, T. O. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. Global // Veterinaria. – 2011. – Vol. 6(1). – P. 06–10.

2. Ghosh R., Barman S., Mandal N.C. Phosphate deficiency induced biofilm formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate // Scientific Reposts. – 2019. – Vol. 9(1).

КОНСЕРВАТИВНЫЙ ОСТАТОК F436 НЕ УЧАСТВУЕТ В СБОРКЕ МЕДНОГО КЛАСТЕРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА, НО СТАБИЛИЗИРУЕТ КОНФОРМАЦИЮ ПОСЛЕДНЕГО В ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЕ

Л.А. Варфоломеева⁶⁰, А.Ю. Соловьева⁶¹, Н.С. Шипков⁶²,
Н.И. Дергоусова⁶³, Т.В. Ракитина⁶⁴, К.М. Бойко⁶⁵,
Т.В. Тихонова⁶⁶, В.О. Попов⁶⁷

Медьсодержащие ферменты катализируют широкий спектр химических реакций, начиная от окисления полисахаридов и заканчивая восстановлением оксида азота N₂O и кислорода. К медьсодержащим ферментам относится тиоцианатдегидрогеназа (trTcDH) из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. TrTcDH катализирует уникальную реакцию окисления тиоцианата с образованием элементарной серы и цианата с последующим последовательным переносом двух электронов на предполагаемый акцептор – цитхром c552. Структура trTcDH является единственной известной на сегодняшний день из этой группы ферментов. Белок представляет собой гомодимер, образованный двумя семилопастными β-пропеллерами. Активный центр trTcDH располагается в полости пропеллера и содержит три иона меди (Cu1, Cu2 и Cu3). Каждый ион меди можно идентифицировать как моноядерный центр типа T2, что отличает медный центр trTcDH от трехъядерного центра мультимедных оксидаз. Семь консервативных остатков гистидина, а также глутамат, аспартат и лизин формируют активный центр фермента. Хотя на сегодняшний момент определены несколько структур trTcDH и на их основе предложен гипотетический механизм каталитической реакции, некоторые важные детали архитектуры активного центра и функционирования фермента изучены недостаточно. В частности, консервативный среди некоторых гомологов trTcDH

остаток фенилаланина, F436, предшествует остатку H437, координирующему ион Cu3. Расположение F436 в активном центре вблизи к иону Cu3 позволило предположить, что F436 может оказаться важным либо для сборки медного кластера в активном центре, либо для протекания каталитической реакции.

Для проверки данной гипотезы была получена мутантная форма trTcDH с заменой F436Q (trTcDH^{F436Q}). Предполагалось, что замена фенилаланина на глутамин с гидрофильной боковой цепью сходного с фенилаланином размера может существенно повлиять на гидрофобные взаимодействия в активном центре. Нами было показано, что замена F436Q привела к полной потере тиоцианат-окисляющей активности, при этом все три иона меди присутствовали в активном центре, согласно масс-спектрометрическим данным. Полученная структура trTcDH^{F436Q} позволила предположить, что этот остаток играет важную структурную роль, стабилизируя активный центр тиоцианатдегидрогеназы и способствуя корректному переходу между открытым и закрытым состояниями фермента, необходимым для связывания субстрата.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №20-14-00314.

⁶⁰ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶¹ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶⁴ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁶⁵ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶⁶ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

⁶⁷ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

НОВАЯ ТЕРМОФИЛЬНАЯ ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНАЯ АЦЕТОГЕННАЯ БАКТЕРИЯ *ACETITALEA AUTOTROPHICA*

А.В. Гололобова⁶⁸, А.Г. Ельченинов⁶⁹, И.В. Кубланов⁷⁰, Е.Н. Фролов⁷¹

Из пробы Нефтяной площадки кальдеры Узон полуострова Камчатка в хемолитоавтотрофных условиях при 70 °C и pH 6,0 был выделен штамм 3819-GS1. Клетки имели палочковидную форму. Длина – 2–6 мкм, диаметр – 0,5–0,6 мкм. Клетки были подвижны за счет полярно расположенного жгутика. Ультратонкие срезы клеток показали наличие грамположительной клеточной стенки. В стационарной фазе роста происходило образование круглых терминальных эндоспор.

Штамм 3819-GS1 являлся облигатным анаэробом, который рос в диапазоне температур 47–75 оС с оптимумом при 65 оС, а также в диапазоне значений pH 6,0–8,5 с оптимумом при pH 7,0. Данный штамм был способен к росту в отсутствии витаминов в среде, при этом скорость роста и урожай клеток не изменялись.

Штамм 3819-GS1 рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов, а также HCO₃⁻/CO₂ в качестве акцептора электронов и источника углерода. Единственным продуктом метаболизма являлся ацетат. Новый изолят не использовал в качестве субстратов какие-либо другие органические и неорганические соединения. Альтернативным акцептором электронов в присутствии H₂ являлась элементная сера, при восстановлении которой происходило образование сульфида.

Последовательность гена 16S рРНК штамма 3819-GS1 имела сходство 91,1 % и 89,4 % с гомологичными последовательностями *Thermanaeromonas toyohensis* и *Thermanaeromonas burensis* соответственно. Филогенетический анализ показал, что штамм 3819-GS1 относится к семейству Thermoanaerobacteraceae и наиболее близок к представителям рода *Thermanaeromonas*. На основании полученных результатов нами был предложен новый род '*Acetitalea*' с типовым видом '*Acetitalea autotrophica*'.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-14-00242.

⁶⁸ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁶⁹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷⁰ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва, Россия

СЕЗОННАЯ СТРУКТУРНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ГРУНТОВЫХ ВОД ГОРОДА МОСКВЫ

Е.В. Груздев⁷², В.В. Кадников⁷³, Ш.А. Бегматов⁷⁴,
А.В. Марданов⁷⁵, Н.В. Равин⁷⁶

Родники – важный компонент экосистемы современных мегаполисов, испытывающий высокие антропогенные нагрузки. Тесная связь родников с водно-болотными угодьями и поверхностными водоемами значительно влияет на формирование биоразнообразия как внутри мегаполисов, так и на прилегающих территориях. А использование родников местными жителями в качестве источника питьевой воды и развития вокруг них рекреационной зоны определяет качество жизни.

Формирование родников напрямую связано с грунтовыми водами, служащими средой обитания для разнообразных микробных сообществ, участвующих в биогеохимических процессах, в том числе процессах биоразложения антропогенных загрязнителей.

В представленной работе были исследованы 5 родников на территории города Москвы расположенных в Ясенево, Битце, Коломенском, Косыгина и Крылатском. Пробы воды из каждого родника были отобраны весной, летом и зимой. Для всех проб измеряли основные физико-химические параметры (pH, температура, окислительно-восстановительный потенциал, элементный и ионный состав), а также определяли таксономические профили микробных сообществ в результате анализа V3-V4 вариационного региона гена 16S рРНК, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Составы микробных сообществ отличались в разных родниках и изменялись в зависимости от времени года. Почти во всех образцах доминируют представители бактерий, только в одном образце, который был отобран в зимний сезон из родника «Крылатское» больше половины сообщества микроорганизмов было представлено археями (рис. 1).

Среди бактерий доминирующим был филум *Proteobacteria*, наибольшая доля которых была представлена в пробах из родников «Коломенское» и «Косыгина» (32.65-56.16% от всего сообщества).

⁷² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷³ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷⁴ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷⁵ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁷⁶ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Большую часть *Proteobacteria* составляют представители *Gamma**proteobacteria*. В весенних образцах из родников «Ясенево», «Битца», «Коломенское» *Gamma**proteobacteria* представлены в основном *Halomonas*, *Alcanivorax*, *Idiomarina*. Представители этих родов могут участвовать в разложении нефтепродуктов, однако, стоит отметить что химический анализ проб воды из этих родников не выявил загрязнения по нефтепродуктам.

Также среди *Gamma**proteobacteria* были обнаружены представители железooksисляющих бактерий семейства *Gallionellaceae* (*Gallionella*, *Ferriphase**lus*, *Sideroxydans*), преимущественно встречающиеся в пробах из родника «Косыгина» (11,88-33,77%). Отдельно стоит отметить психрофильных *Gamma**proteobacteria*, принадлежащих роду *Rhodofera**x* в зимней пробе родника в Крылатском, составляющие 15,56% от микробного сообщества.

Вторым по представленности являются некультивируемые прокариоты, филума *Patescibacteria*, с наибольшими долями в пробах из родников «Ясенево» и «Битца». Так представители *Patescibacteria* составляют 1/3 всего микробного сообщества зимней пробы из родника «Ясенево». Большая часть *Patescibacteria* в исследуемых родниках представлена классом *Parcubacteria*.

Среди других бактериальных филумов стоит отметить *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi*, *Methylomirabilota*, *Nitrospirota*, *Verrucomicrobiota* на долю которых приходится >5% микробного сообщества как минимум в одной из проб.

Большая часть архей представлена *Nanoarchaeota*. Они, как и *Patescibacteria* являются некультивируемыми прокариотами. Наибольшее присутствие *Nanoarchaeota* идентифицировано в зимних образцах. Вторыми по представленности археями являются *Crenarchaeota*, доля которых незначительно варьирует на протяжении года во всех образцах, кроме «Косыгина», где наблюдается рост доли *Crenarchaeota* в зимнем образце.

В целом, полученные результаты позволили впервые выявить сезонную вариабельность микробных сообществ грунтовых вод города Москвы.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-34-70027 мол_a_мос

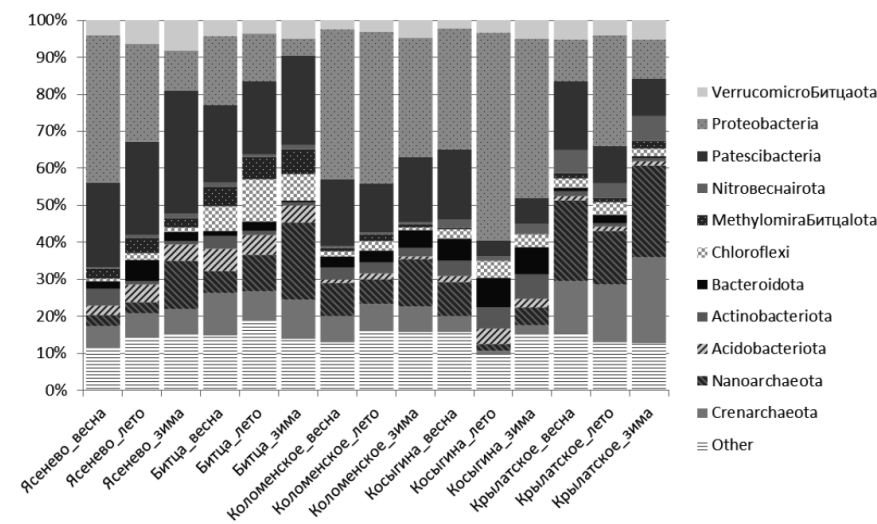


Рис. 1. Разнообразие микробного сообщества родников Москва на уровне филумов

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИТОКСИНА

Е. В. Гурина⁷⁷, А. С. Васильченко⁷⁸, А. В. Яшников⁷⁹

Глиотоксин (ГТ) является токсином грибов и относится к классу эпиполитиодиоксопиперазинов, характеризующиеся внутри- или межмолекулярным серным мостиком и ядром дикетопиперазина, которое образуется в результате конденсации двух аминокислот (Scharf et al., 2016). Наличие дисульфидного мостика в молекуле ГТ определяет токсичность на эукариотические клетки. Конкретный механизм токсического действия обусловлен продукцией активных форм кислорода (АФК) в цикле окисления-восстановления дисульфидного мостика. АФК вызывают одно- или двуцепочечные разрывы ДНК. Также ГТ может образовывать смешанные дисульфидные связи с белками, что приводит к инактивации различных ферментов, содержащих цистеин в своем активном центре (Scharf et al., 2016).

Актуальность настоящего исследования определяется тем фактом, что существующие данные о действии ГТ на бактериальные клетки не детализированы и не затрагивают механизм действия.

Материалы и методы. В качестве продуцента ГТ использовали *Aspergillus fumigatus* МХ59. Для получения антимикробного соединения *A. fumigatus* МХ59 культивировали на питательной среде Вейндлинга, в течение 4 суток при постоянной температуре (28°С) и перемешивании (100 об/мин). Экстракцию антимикробного соединения из фильтрата культуральной жидкости *A. fumigatus* МХ59 осуществляли методом жидкость-жидкостной экстракции с использованием хлороформа. Далее хлороформ упаривали на роторном испарителе с получением сухого остатка, который повторно растворяли в 96%-ном этаноле. Полученный раствор помещали на ночь на холод (4°С) для лучшей кристаллизации ГТ (Stanley et al., 1946). Чистоту ГТ проверяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В качестве тест-штаммов использовали грамположительные и грамотрицательные бактерии. Установлены минимально ингибирующая концентрация (МИК) и минимально бактерицидная концентрация (МБК). Оценена динамика бактерицидного эффекта ГТ. Продукцию активных форм кислорода и продукцию белков теплового шока оценивали с использованием различных биолуминесцентных репортерных штаммов

⁷⁷ Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО). Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия.

⁷⁸ Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО). Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия.

⁷⁹ Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО). Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия.

E. coli MG1655. Перекисное окисление липидов оценивали путем измерения образования малонового диальдегида (МДА). Для определения состояния клеточных мембран бактерий проводили флуоресцентную микроскопию с красителями Live/Dead.

Результаты. Было обнаружено, что ГТ был более эффективен против грамположительных бактерий. Результаты показали, что грамположительные бактерии погибали при более низких концентрациях по сравнению с грамотрицательными. Значения МИК и МБК были одинаковыми для всех тестируемых бактерий, что характеризовало механизм действия ГТ как бактерицидный.

Известно, что ГТ взаимодействует в эукариотических клетках с свободными тиоловыми группами внутриклеточных белков. Мы оценили влияние различных тиол-содержащих веществ на антимикробные свойства глиотоксина.

С использованием биolumинесцентных штаммов было установлено, что при воздействии ГТ в бактериальных клетках возникает окислительный стресс и повышается продукция белков теплового шока. Однако в тесте на определение МДА было установлено, что ГТ в бактерицидных концентрациях не оказывает окисления клеточных липидов, в отличие от перекиси водорода (позитивный контроль). Добавление в реакционную среду 2-меркаптлэтанола и восстановленного глутатиона в несколько раз снижало активность ГТ, а добавление антиоксиданта Тролокса не влияло на бактерицидные свойства ГТ. С использованием флуоресцентной микроскопии было установлено, что 4-х часовая экспозиция бактерий с ГТ ведет к повреждению клеточных мембран, возможно в результате денатурации мембранных белков.

Список литературы:

1. Scharf D. H. Gliotoxin – bane or boon? // Environ. Microbiol. 2016. Vol. 18, № 4. P. 1096–1109.
2. Stanley N. F., Mills J. A. The biological activity of a substance resembling gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus fumigatus* // Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1946. Vol. 24, № 2. P. 133–138.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ GPCR С ЛИГАНДАМИ

Д.Е. Дашевский⁸⁰, А.П. Лугинина⁸¹, П.А. Хорн⁸², А.В. Мишин⁸³

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), играют важнейшую роль в зрении, нервной и гуморальной деятельности, иммунных реакциях, обмене веществ – и во многих других физиологических процессах в организме человека и, как следствие, участвуют в развитии огромного числа заболеваний. Именно поэтому GPCR являются мишенями для огромного числа лекарственных препаратов, а задача поиска новых лигандов и анализ их взаимодействия с рецепторами является одной из ключевых в современной фармакологии [1]. Существует ряд методов, направленных на измерения константы диссоциации лиганда с водорастворимым белком, однако для их адаптации к мембранным рецепторам необходимо проведение оптимизации с учётом использования мембраномоделирующих систем.

Целью данной работы является разработка метода, на основе известных технологий для водорастворимых белков, для быстрого и простого в выполнении измерения константы диссоциации GPCR с его лигандами. В качестве методов для решения поставленной задачи используется микромасштабный термофорез (MST), анализ теплового сдвига (TSA).

MST позволяет проводить количественный анализ белковых взаимодействий в свободном растворе. Для определения константы взаимодействия в методе измеряется подвижность молекул в температурном градиенте. При связывании изучаемого белка с молекулой-партнёром его подвижность в растворе изменяется, что может быть детектировано по флуоресценции одного из партнёров по связыванию [2]. MST выгодно отличается от других способов измерения константы связывания, тем что позволяет значительно облегчить пробоподготовку, сократить время проведения эксперимента и количество затрачиваемого образца.

В методе TSA связывание с лигандом определяется по изменению температуры плавления белка. Благодаря систематическому повышению температуры и сопутствующему мониторингу флуоресценции можно наблюдать за термической денатурацией [3]. Стабильность белка количественно определяется по температуре плавления (Tm), которая может быть повышена за счёт связывания с лигандом [4]. Данное увеличение

⁸⁰ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Москва, Россия

⁸¹ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Москва, Россия

⁸² Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Москва, Россия

⁸³ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Москва, Россия

температуры плавления называется тепловым сдвигом, который показывает увеличение стабильности белка. Температура плавления в наших экспериментах определяется при помощи изменения флуоресценции либо ароматических аминокислот белка, в случае с наноразмерной сканирующей флуорометрией (nanoDSF) [5], либо флуоресценции красителя 7-диэтиламин-3-(4'-малеимадилфенил)-4-метилкумарина (CPM) [6].

В результате проделанной работы были получены данные по связыванию GPCR с агонистом и антагонистом рецептора. Для MST и TSA, вычислены константы связывания для GPCR, находящегося в различных мембраномоделирующих системах, таких как мицеллы и нанодиски.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №22-74-00024.

Список литературы:

1. Hauser A.S. et al. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications // Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 16, № 12. P. 829–842.
2. Seidel S.A.I. et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions // Methods. Academic Press Inc., 2013. Vol. 59, № 3. P. 301–315.
3. Huynh K., Partch C.L. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay // Curr. Protoc. protein Sci. 2015. Vol. 79, № February. P. 28.9.1-28.9.14.
4. Lo M.C. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery // Anal. Biochem. 2004. Vol. 332, № 1. P. 153–159.
5. Bolormaa Baljinnyam, Michael Ronzetti, Adam Yasgar A.S. Applications of Differential Scanning Fluorometry and Related Technologies in Characterization of Protein–Ligand Interactions // Lang. Soc. Power. An Introd. 2001. Vol. 3, № Chapter 4. P. 56–74.
6. Alexandrov A.I. et al. Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins // Structure. 2008. Vol. 16, № 3. P. 351–359.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ГОМОЛОГА МАКРОЛАКТИНА И СУРФАКТИНОВ ОПРЕДЕЛЯЮТ ФИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ РИЗОСФЕРНОГО МИКРООРГАНИЗМА – BACILLUS VELEZENSIS X-BIO-1

Д.С. Дилбарян⁸⁴, О.В. Доманская⁸⁵, А.С. Васильченко⁸⁶

Микроорганизмы рода *Bacillus* зарекомендовали себя в качестве эффективных биологических средств защиты от патогенных микроорганизмов. Основопологающим фактором, определяющим целесообразность использования микроорганизмов данного рода для борьбы с вредителями, является продукция ряда антимикробных соединений. Бактерии рода *Bacillus* также характеризуется способностью к спорообразованию, что позволяет им быстро и эффективно адаптироваться к неблагоприятным условиям внешней среды [Rabbee и др., 2019]. Поскольку микроорганизмы *Bacillus* являются естественными обитателями ризосферы, биологические препараты на основе спор *Bacillus* не наносят существенного ущерба почвенным микробным сообществам и растениям [Ongena и др., 2007].

Несмотря на то, что с конца XX века были обнаружены десятки соединений, продуцируемых бактериями рода *Bacillus* и обладающих антимикробным действием, до сих пор малоизученными остаются антимикробные свойства выделенных метаболитов [Caulier и др., 2019]. В ходе данной работы были исследованы антимикробные характеристики антибиотика макролидной природы – гомолога макролактина и соединений из класса липопептидов – гомологов сурфактина, полученных из *Bacillus velezensis* X-BIO-1. Также был исследован фитопротекторный эффект комбинации метаболитов бациллы и серосодержащего микотоксина глиотоксина на семена злакового растения.

Культивирование штамма-продуцента для наработки метаболитов производилось в жидкой среде LB в течение 48 ч при 28°. Очистка культуральной жидкости от клеточной биомассы достигалась осаждением при 8000 об/мин. Извлечение макролидного антибиотика из культуральной жидкости производилось путем трехкратной жидкость-жидкостной экстракции этилацетатом. Экстракция липопептидов была достигнута путем преципитации HCl при 4°. Методом ВЭЖХ были получены фракции

⁸⁴ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁸⁵ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁸⁶ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

метаболитов с чистотой >75%. Масс-спектрометрический анализ показал, что соединение из класса макролидов представлено гомологом макролактина с молекулярной массой [M+Na] 425,06794, липопептиды представлены гомологами сурфактина с молекулярной массой [M+H⁺] 1021,53761 и [M+H⁺] 1035,55404.

Бактерицидный эффект макролактина был установлен в отношении грамотрицательных микроорганизмов, в том числе фитопатогенной бактерии *Pectobacterium carotovorum* ВКМ-Б-1247. Против грамположительных микроорганизмов макролактин проявлял бактериостатический эффект (*Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus cereus* IP 5832, *Enterococcus faecium* 79 OSAU). В тесте «time-kill assay» макролактин показал развитие бактерицидного эффекта в отношении *P. carotovorum* ВКМ-Б-1247 в течение 2 ч при концентрации 2 МИК. В свою очередь сурфактины продемонстрировали фунгицидный эффект в отношении *Fusarium solani* и *Aspergillus niger*.

Методом влажных камер было установлено, что сурфактины в концентрации 5 мг/мл в комбинации с глиотоксином 0,3 мг/мл имеют фитопротекторный эффект на семена пшеницы, защищая их от поражений, вызванных деятельностью фитопатогенных грибов (процент поражения <10%). Также было показано, что данный вариант обработки не оказывает негативного воздействия на ростовые параметры семян (всхожесть семян >90%).

Метаболиты микроорганизма *Bacillus velezensis* X-BIO-1 обладают фитопротекторным эффектом и в комбинированном варианте могут использоваться для защиты растений от бактериозов и заболеваний, вызванных деятельностью фитопатогенных грибов.

Список литературы:

1. Rabbee, M.F., Sarafat, A., Jinhee, C. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes, *Molecules*, 2019, 24(6), p. 1–14.
2. Ongena, M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.L., Thonart P. Surfactin and Fengycin Lipopeptides of *Bacillus subtilis* as Elicitors of Induced Systemic Resistance in Plants, *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4), p. 1084–1090.
3. Caulier, S., Nannan K., Gillis A, Licciardi F., Bragard C. and Mahillon J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group, *Front. Microbiol.*, 2019, 10(302), p. 1–19.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ КИШЕЧНИКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCHORHYNCHUS MYKISS*)

Д.А. Доколин⁸⁷, Ю.В. Зайцева⁸⁸, И.В. Злобин⁸⁹

Сектор аквакультуры вносит основной вклад в мировое производство продуктов питания. В настоящее время рыбная продукция играет важную роль в продовольственной корзине населения и производстве кормов для сельскохозяйственных животных. Однако процессы интенсификации производства товарной рыбы за счет увеличения плотности содержания особей связаны с риском возникновения вспышек инфекций, что представляет угрозу устойчивому развитию предприятий. Интенсивное использование антибиотиков в ветеринарии приводит к повышению уровня химических остатков в окружающей среде и появлению штаммов, устойчивых к широкому спектру антибактериальных препаратов.

Желудочно-кишечный тракт представляет собой сложную среду, населенную разнообразными группами микробных сообществ. Кишечные бактерии играют важную роль в поддержании нормальной физиологии, питания, здоровья, гомеостаза, защиты от патогенов и функционирования иммунной системы рыб. Этот факт привлек значительное внимание к поиску потенциальных пробиотических, симбиотических и патогенных бактерий, которые могут оказывать глубокое влияние на физиологию и здоровье хозяина. Наличие генов вирулентности и устойчивости к антибиотикам у кишечных бактерий может иметь серьезные последствия как для здоровья рыб, так и для человека.

В данной работе мы исследовали таксономический состав и профиль резистентности к антибиотикам кишечных бактериальных сообществ *Onchorhynchus mykiss* в условиях садкового хозяйства «Ярославская форель».

Для исследования изъяли 10 половозрелых особей радужной форели, у которых иссекали кишечник и отбирали внутреннее содержимое. Образцы содержимого гомогенизировали в 0,9% растворе NaCl с помощью гомогенизатора в соотношении 1:9. Исходные гомогенаты подвергали десятикратному разведению и высевали по 50 мкл

⁸⁷ Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

⁸⁸ Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

⁸⁹ Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

на чашки Петри с обедненным мясопептонным агаром (МПА). Чашки инкубировали при 28°C в аэробных условиях в течение 48 часов, после чего подсчитывали число колоний и рассчитывали величину КОЕ/г для каждого образца. Определение выделенных изолятов микроорганизмов проводили по совокупности морфологических, биохимических и культуральных свойств, после чего выделяли в чистую культуру основных представителей групп. Устойчивость изолятов к антибактериальным препаратам (АБП) определяли диск-диффузионным методом для следующих веществ: рифампицин (5 мкг/мл), ампициллин (10 мкг/мл), гентамицин (10 мкг/мл), тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (30 мкг/мл), метронидазол (30 мкг/мл). Филогенетическую идентификацию штаммов проводили на основании результатов секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

Установлено, что общая бактериальная обсемененность кишечника радужной форели составила 8.1×10^3 КОЕ/г, что сопоставимо с данными ранее проведенных исследований. Культивируемый микробиом кишечника *O. mykiss* был представлен микроорганизмами, относящимися к филумам *Actinobacteria* (роды *Micrococcus*, *Microbacterium* и *Rhodococcus*), *Proteobacteria* (роды *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Aeromonas* и *Lysobacter*), *Firmicutes* (род *Staphylococcus*) и *Bacteroidetes* (роды *Kaistella* и *Chryseobacterium*).

Определение резистентности исследуемых штаммов микроорганизмов к различным АБП показало, что большинство из них были чувствительны к тетрациклину, рифампицину и гентамицину (100%, 97,6% и 96,3% соответственно). Наименьшую эффективность проявлял метронидазол: к нему оказались устойчивы примерно 23% штаммов. Для ампициллина и канамицина показатель чувствительности составил 87% и 95,2% соответственно (Рис. 1).

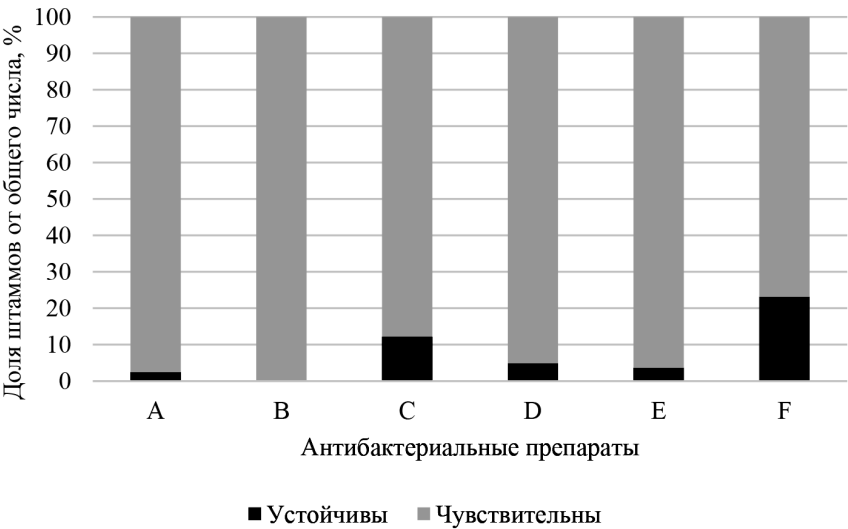


Рис. 1. Чувствительность штаммов к различным АБП.
А – рифампицин; В – тетрациклин; С – канамицин; D – ампициллин;
Е – гентамицин; F – метронидазол

Анализ профиля антибиотикорезистентности выделенных изолятов показал, что большинство исследованных штаммов (50%) были устойчивы лишь к одному препарату. Устойчивость к двум использованным АБП проявили 17% штаммов микроорганизмов. Мультирезистентность (устойчивость к трем и более АБП) продемонстрировали 13% изолятов. Группа мультирезистентных штаммов включала представителей родов *Pseudomonas*, *Kaistella* и *Psychrobacter*.

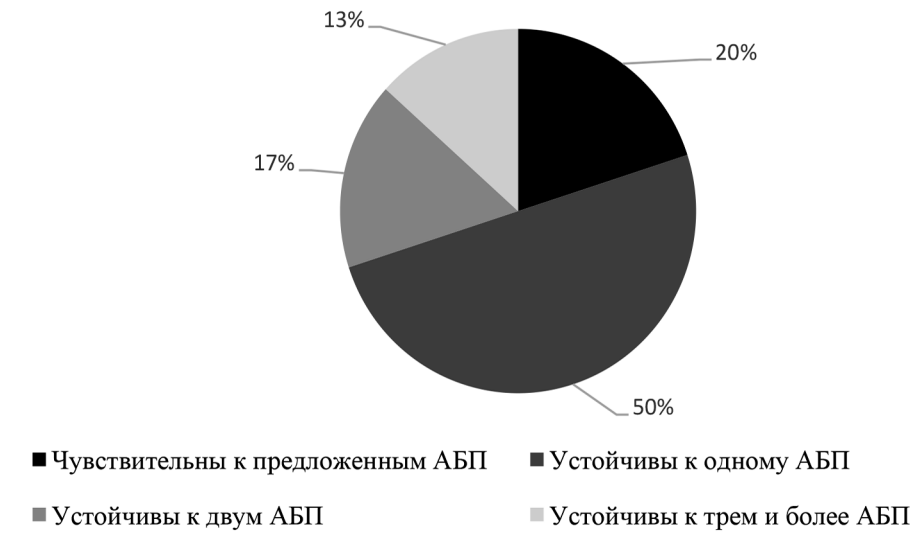


Рис. 2. Профиль антибиотикорезистентности исследованных штаммов

Таким образом, микробиом кишечника радужной форели состоял как из комменсалов, так и из условно-патогенных микроорганизмов. Интенсивное использование антимикробных препаратов предполагает потенциальный риск распространения антибиотикорезистентных штаммов, что создает угрозу для здоровья рыб и человека. Сохранение здоровой микрофлоры кишечника и ограниченное использование антибиотиков являются одними из необходимых условий для успешного управления аквакультурой.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-20123, <https://rscf.ru/project/22-26-20123/>

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПЕРЕХОДОВ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ В ЛИПИД-ДЕТЕРГЕНТНЫХ СИСТЕМАХ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЙАНИЯ

Е.А. Дронова⁹⁰, Ю.Л. Рижиков⁹¹, В.И. Горделий⁹², А.И. Куклин⁹³

Мембранные белки (МБ) в клетках ответственны за выполнение огромного числа задач, в том числе они выполняют транспортную, сигнальную, регуляторную, энергетическую и др. функции [1]. Сложно переоценить физиологическую значимость МБ, ведь примерно треть всего генома человека кодирует МБ, что обуславливает применение МБ при дизайне таргетных фармпрепаратов [2]. Ввиду ряда особенностей, кристаллизация МБ – процесс более сложный, нежели чем кристаллизация водорастворимых белков. От общего количества решённых белковых структур уникальные структуры МБ составляют всего 1% [3], [4]. Кристаллизация в «бицеллах» – один из возможных путей кристаллизации МБ, впервые предложенный в работе [5] ещё в 2002 году. Однако ввиду недостаточного представления о структурном аспекте этого процесса, получение воспроизводимых и достоверных результатов до сих пор является непростой задачей.

Как было показано ранее, ключевой этап для формирования кристаллов МБ при кристаллизации в бицеллах – это переход из фазы с бицеллами в гелеобразную фазу с «риббонами» (от англ. *ribbon*) – вытянутыми фрагментами липидного бислоя [6], происходящий самопроизвольно в течение недели или двух, считая от постановки кристаллизации. Целью настоящего исследования было изучить способы ускоренно индуцировать образование «риббон-фазы» ещё на этапе подготовки проб. Для получения более глубокого понимания влияния внешних факторов на процесс кристаллизации методами малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) были исследованы системы, содержащие две различные концентрации бицелл. При этом варьировались такие параметры как концентрация солей и температура.

⁹⁰ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия. E-mail: dronova.ea@phystech.edu

⁹¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия

⁹² Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Гренобль, Франция

⁹³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия

В качестве целевых детергента и липида была выбрана смесь CHAPSO и DMPC с молярным соотношением $Q[DMPC/CHAPSO]=2.7$, по аналогии с работами [6], [7]. Был приготовлен исходный образец с концентрацией 20%, который далее был разбавлен до 14% и 5,6% с помощью H_2O и 2.4M Na/KPi (pH=4.6). 4 полученные пробы были помещены в капилляры для дальнейшего исследования на установке Rigaku MicroMax-007HF (МФТИ, Долгопрудный, Россия) методом МУРР. Концентрации образцов 5.6% и 14% выбраны в соответствии со стартовой и финальной концентрациями в соответствии со статьёй [6]. При кристаллизации используются различные преципитаты, в том числе Na/KPi, в связи с чем дополнительной задачей было оценить влияние концентрации соли на морфологический переход в липид-детергентной системе.

Исследование проводилось в три этапа: температурный скан от 6 °C до 41 °C с шагом в 7 °C; инкубация при 37 °C в течение 7–10 дней; инкубация при 4 °C в течение 5–7 дней. Было обнаружено, что уже на начальном этапе сразу после подготовки образцов растворы представляли собой смесь из бицелл с некоторым количеством риббонов.

Результаты измерений при температурном скане показали, что и для высокой, и для низкой концентраций соли изменение температуры давало изменение кривой рассеяния, однако оно может быть описано в рамках изменения форм-фактора бицелл, возникающего из-за изменения толщины липидного бислоя. При этом соотношение бицелл и риббонов заметным (для метода МУРР) образом не изменилось.

Далее была проведена длительная (7-10 дней) инкубация при температуре 37 °C, характерной для кристаллизаций в бицеллах, и в ходе этого было обнаружено, что в случае высокой концентрации соли существенных морфологических изменений не произошло. Однако в случае с нулевой концентрацией соли был обнаружен переход в состояние мультламеллярных везикул (МЛВ), детектированных как при помощи МУРР по набору дифракционных пиков, так и с помощью визуального осмотра за счёт изменения оптических свойств образца (прозрачная до инкубации жидкость приобрела мутный белый вид).

Согласно материалам статьи [6] образование МЛВ является завершающей стадией морфологических преобразований (бицеллы → риббоны → везикулы), наблюдаемых при кристаллизации МБ. Это даёт основание предположить, что промежуточная фаза «риббонов» хоть и не была задетектирована, но существовала в течение некоторого времени, однако это требует проведения дополнительных исследований для подтверждения. Но уже сейчас на основании полученных данных можно утверждать, что уменьшение концентрации солей преципитата способствует ускорению протекания морфологических преобразований, характерных для кристаллизации, так как в присутствии преципитата ни резкое изменение температуры в процессе скана, ни длительная инкубация (при 4 °C и 37 °C) не вносят существенных изменений в вид кривых рассеяния.

Список литературы:

[1] Von Heijne, G. The membrane protein universe: What's out there and why bother? J. Intern. Med. 261, 543–557 (2007).

[2] Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? Nat. Rev. Drug Discov. 5, 993–996 (2006).

[3] MPSTRUC. Membrane Proteins of Known 3D Structure. <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>

[4] PDB Statistics. Number of Unique Protein Sequence Clusters within Released PDB Structures (Annual) at identity 95%. <https://www.rcsb.org/stats/sequence/cluster-ids-95>

[5] Faham, S. & Bowie, J. U. Bicelle crystallization: A new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. J. Mol. Biol. 316, 1–6 (2002).

[6] Murugova, T. et al. Mechanisms of membrane protein crystallization in ‘bicelles’ Scientific Reports 12, 11109 (2022).

[7] Ming Li et al. Morphological Characterization of DMPC/CHAPSO Bicellar Mixtures: A Combined SANS and NMR Study Langmuir 29, 15943-15957 (2013).

ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ МУРАВЕЙНИКОВ ЗАЛЕЖНЫХ ЗЕМЕЛЬ

А.А.Дымова⁹⁴, Н.В. Костина⁹⁵, М.В. Голиченков⁹⁶

Залежные земли занимают в России более 4 млн га. Несмотря на их обедненность, муравьи различных видов заселяют почвы, выведенные из сельскохозяйственного использования, улучшая их физические, химические и биологические свойства.

Муравьи существенно изменяют физическую структуру почвы, влияют на химический состав почвы, обогащая ее различными элементами и способствуют развитию более разнообразного микробного комплекса, способного улучшать микробиологические свойства залежных земель. Внутри муравейников создается свой особый микробиом, что является следствием разнообразных функций, выполняемых муравьями и активной жизнедеятельности внутри муравейников.

Объектами исследования являлись муравейники и муравьи видов *Lasius niger* и *Lasius flavus*, а также интактная (контрольная) почва, не подвергающаяся воздействию жизнедеятельности муравьев, отобранные с поля, выведенного из сельскохозяйственного использования более 15 лет назад.

Для изучения бактериального комплекса данных объектов проводили посевы на плотные питательные среды (глюкозо-пептонно-дрожжевую, Эшби) с проведением идентификации выделенных культур с помощью системы MALDI-TOF MS - метода ионизации, позволяющего ионизировать биологические макромолекулы под воздействием лазера. Были проведены биохимические тесты с помощью специальных наборов для идентификации различных родов бактерий. Также первично был проведен анализ чувствительности выделенных бактериальных культур к различным группам широко применяемых антибиотиков диско-диффузионным методом.

По полученным результатам можно сказать, что микробные комплексы муравейников и муравьев отличались от комплекса контрольной почвы более широким видовым разнообразием.

В контрольной почве преобладали бактерии рода *Bacillus*, широко распространенные в окружающей среде и способные создавать споровые формы в неблагоприятных

⁹⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН

⁹⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁹⁶ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

условиях. Также в микробном комплексе интактной почвы присутствовали типично почвенные культуры, такие как *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* и др. В микробных комплексах муравейников и муравьев, преобладали бактерии родов *Acinetobacter*, *Raoultella*, *Serratia*, *Paenarthrobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и др. Некоторые из этих микроорганизмов отличались по ряду биохимических показателей от референсных штаммов, а также показали высокую устойчивость к различным группам антибиотиков. Помимо вышеперечисленных микроорганизмов, в составе бактериальных комплексов, ассоциированных с муравьями, присутствуют штаммы, которые трудно идентифицировать стандартными методами и в данный момент проводится полномасштабное секвенирование наиболее интересных культур.

Полученные данные свидетельствуют о том, что муравьи создают в ареале своей жизнедеятельности более высокое разнообразие бактерий, из которых многие могут быть видоспецифичны и являться устойчивыми к различным условиям окружающей среды. Бактериальные комплексы, развивающиеся в таких условиях, могут способствовать сохранению микробного биоразнообразия в обедненных залежных почвах и приводить к улучшению их свойств в будущем.

СРЕДА ОБИТАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ГРУЗОВОГО БЛОКА (ФГБ) РС МКС. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В ТЕЧЕНИЕ ПОСЛЕДНИХ ПЯТИ ЛЕТ

А.А. Дымова⁹⁷, К.А. Шеф⁹⁸, С.В. Орлова⁹⁹,
С.А. Харин¹⁰⁰, С.В. Поддубко¹⁰¹

Аннотация: За период всего времени эксплуатации Российского сегмента Международной космической станции (РС МКС) проводится регулярный мониторинг среды обитания каждого модуля. В данной работе представлена оценка условий жизнедеятельности, создаваемых во внутреннем объеме функционально-грузового блока «Заря» (ФГБ), которые могут способствовать благоприятному развитию условно-патогенных микроорганизмов. В настоящий момент все большее значение приобретает комплексная и детальная оценка микроорганизмов во внутреннем объеме ФГБ. Результаты, полученные в течении последних 5 лет, могут дать новые направления изучения микробного комплекса среды обитания, а также быть применены к проектам по освоению ближайшего космоса и пилотируемых программ.

Ключевые слова: ФГБ, РС МКС, микрофлора среды, замкнутые объекты, микробиология, среда обитания

Abstract: During the entire period of operation of the Russian Segment of the International Space Station (ISS RS), the habitat of each module is regularly monitored. This article presents an assessment of the living conditions created in the internal volume of the Zarya functional cargo block (FGB), which can contribute to the favorable development of opportunistic microorganisms. At the moment, a comprehensive and detailed assessment of microorganisms in the internal volume of the FGB is becoming increasingly important. The results obtained during the last 5 years can give new directions for studying the microbial complex of the environment, as well as be applied to projects for the exploration of the near space and manned programs.

Keywords: FGB, ISS RS, environmental microflora, closed objects, microbiology, habitat

⁹⁷ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН

⁹⁸ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН

⁹⁹ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН

¹⁰⁰ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН

¹⁰¹ Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН

В течение периода эксплуатации МКС проводились исследования микробного сообщества во внутренней среде ФГБ. Наибольший интерес представляют микроорганизмы, способные выживать в экстремальных условиях под воздействием различных космофизических факторов.

Объектами исследования являются микроорганизмы, выделенные в рамках микробиологического мониторинга Российского сегмента МКС в периоде с 2018 по 2022 (с 56/57 по 66 экспедицию). В течении исследуемого периода регулярно проводился отбор проб с поверхностей интерьера и оборудования, включая запанельные пространства.

Образцы биоматериала исследовались и анализировались с помощью функционального метода, основанном на масс-спектрометрическом анализе (MALDI BIOTYPER).

В результате исследования количественного содержания и видового состава микроорганизмов, формирующихся в ФГБ, были обнаружены культуры, являющиеся нормальными представителями микрофлоры человека, а также спорообразующие микроорганизмы, устойчивые к условиям космического полета. Среди выделенных и идентифицированных микроорганизмов наиболее распространенными являлись представители рода *Staphylococcus*, такие как: *S. epidermidis* (24%), *S. Aureus* (12%), *S. Capitis* (12%), а также доминантами в микробном сообществе являлись представители рода *Bacillus*, самым распространенным среди которых является *Bacillus Licheniformis* (21%). Микроорганизмы рода *Bacillus* устойчивы к экстремальным условиям окружающей среды, поэтому требуют детального изучения и представляют собой особый интерес при разработке новейших методик и средств профилактики для построения баз на других космических объектах, а также для дальних космических полетов. Необходимо продолжать мониторинг среды обитания ФГБ для дальнейшего изучения и оценки изменения микробного комплекса в герметизированном объекте.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПУТЕЙ C1-АССИМИЛЯЦИИ У ГАММАПРОТЕОБАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАНОТРОФОВ МЕТОДОМ МУТАГЕНЕЗА

С.В. Егорова¹⁰², С.Ю. Бут¹⁰³

Метанотрофы – широко распространенная группа аэробных микроорганизмов, использующих метан или метанол в качестве источника углерода и энергии. Метанотрофы используют три пути ассимиляции углерода: рибулозомонофосфатный (РМФ), сериновый или цикл Кальвина. Метанотрофы класса *Alphaproteobacteria* (II тип) используют сериновый путь C1 ассимиляции. Метанотрофы филума *Verrucomicrobia* ассимилируют углерод на уровне CO₂ через цикл Кальвина. Гаммапротеобактериальные метанотрофы (Ia и Ib типы) используют РМФ цикл как основной путь ассимиляции C1, между тем геномный анализ показывает наличие генов, кодирующих другие пути: сериновый цикл (у всех протеобактериальных метанотрофов) и цикл Кальвина (у представителей типа Ib). В то же время функциональная роль этих альтернативных путей остается неясной. Ранее мы получили мутанты гаммапротеобактериального метанотрофа *Methylovibrio mobilis* *alcaliphilum* 20Z с инактивированными генами *sga*, *sgahpr* и *mcl*. Мутанты демонстрировали выраженные фенотипы, отличающиеся от дикого типа, а именно замедленный рост на метаноле для Δsga и $\Delta sgahpr$ и ауксотрофия по глицину для Δmcl . Цель данной работы – получение мутантов по ключевым генам серинового цикла для модельного представителя метанотрофов Ib типа *Methylococcus capsulatus* Bath, их сравнение с полученными ранее мутантами метанотрофа Ia типа *Mm. alcaliphilum*. Для выявления роли серинового цикла и цикла Кальвина у гаммапротеобактериальных метанотрофов проводили оценку метаболических профилей полученных мутантов и диких штаммов при различных условиях выращивания.

У полученного мутанта *Mc. capsulatus* с инактивацией гена *sga* наблюдали снижение скорости роста, по сравнению с диким типом, а также более длительную лаг-фазу. Аналогичный результат наблюдался у мутанта *Mm. alcaliphilum* Δsga , причем замедление более выражено на метаноле. Можно предположить, что сериновый цикл важен в метаболизме как метанотрофов Ia, так и Ib типа.

¹⁰² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия

¹⁰³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия

При анализе внутриклеточных метаболитов у мутантного штамма отмечено повышение содержания глутамата, серина, аланина, глицина, метионина, лейцина, изолейцина, а также сукцината (Рис.1). Возрастание содержания сукцината указывает на активацию анаплеротической функции ЦТК при инактивации серинового цикла, что также наблюдалось для метанотрофа Ia типа. Серин, аланин и глутамат являются субстратами серин-глиоксилатаминотрансферазы, хотя кинетические параметры этого фермента указывают на его наиболее высокую эффективность в реакции с серином, поэтому увеличение пула данных аминокислот вполне закономерно. Повышение содержания глицина может быть результатом неспецифичности других аминотрансфераз. Кроме того, у метанотрофов активна реакция конденсации формальдегида в виде 5,10-метилентетрагидрофолата с образованием серина, катализируемая серингидроксиметилтрансферазой (К.Ф. 2.1.2.1). Именно эта реакция вовлекает C1-единицы в сериновый цикл и является ключевой для его функционирования. Возможно, что у *Mc. capsulatus* Bath присутствует некая регуляция, которая подавляет эту реакцию при нарушении функционирования серинового цикла (например, ингибирование избытком серина), что и ведет к возрастанию внутриклеточного содержания глицина. Также несколько удивляет повышение пула метионина, лейцина, изолейцина, поскольку данные аминокислоты не являются субстратами серин-глиоксилатаминотрансферазы и напрямую не вовлечены в сериновый цикл. Можно предположить, что этот эффект является опосредованным результатом возрастания содержания серина и глутамата, поскольку они являются предшественниками или косубстратами в синтезе этих аминокислот. В целом, увеличение пула ряда аминокислот при инактивации серинового цикла указывает на активное вовлечение данного пути в метаболизм изучаемого метанотрофа.

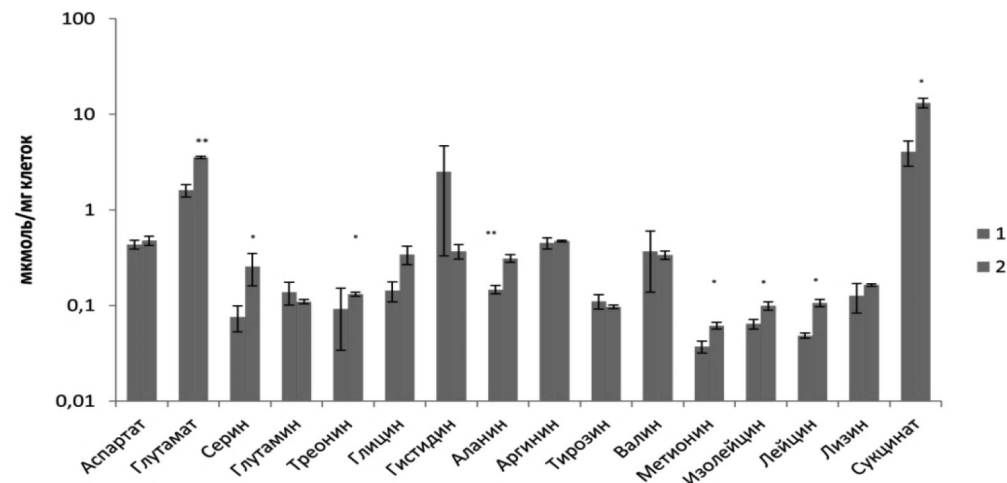


Рис. 1. Внутриклеточные метаболиты у дикого типа и мутанта *Mc. capsulatus* Bath. 1 – дикий тип Bath, 2 – Δ sga. * - $0.05 < p$; * - $0.01 < p$

Полученный мутант метанотрофа *Mc. capsulatus* Bath с инаktivированным геном *mtl* имел низкую скорость роста, которая увеличивалась в 2 раза при добавлении

в среду глицина, но не достигала скорости роста штамма дикого типа (Рис. 2). Интересно, что аналогичный мутант для метанотрофа Ia типа имел ауксотрофию по глицину. Мы предполагаем, что кроме реакции, катализируемой малил-КоА лиазой, регенерация акцептора C1-единиц, глицина, может происходить в результате превращений фосфогликолата, образуемого в оксигеназной реакции РубисКо через гликолат и глиоксилат с участием фосфогликолатфосфатазы (MCA2583, КФ 3.1.3.18) и гликолатоксидазы (MCA1499, MCA1500, MCA1501).

Анализ внутриклеточных метаболитов при этом не выявил повышения пула серина, глутамата и аланина, которое ранее наблюдалось у мутантного штамма *Mm. alcaliphilum* Δ mtl и было, по всей видимости, вызвано нехваткой глиоксилата в реакциях трансаминирования, где данные аминокислоты являлись донорами аминогруппы. Мы ранее предполагали, и очевидно, это верно и для метанотрофов Ib типа, что данный дефект связан с нехваткой ацетил-КоА. Помимо глиоксилата, продуктом реакции, катализируемой малил-КоА лиазой, является также ацетил-КоА, последний необходим для построения внутрицитоплазматических мембран, которые, в свою очередь, необходимы для функционирования метаномонooksигеназы – ключевого фермента для метанотрофов.

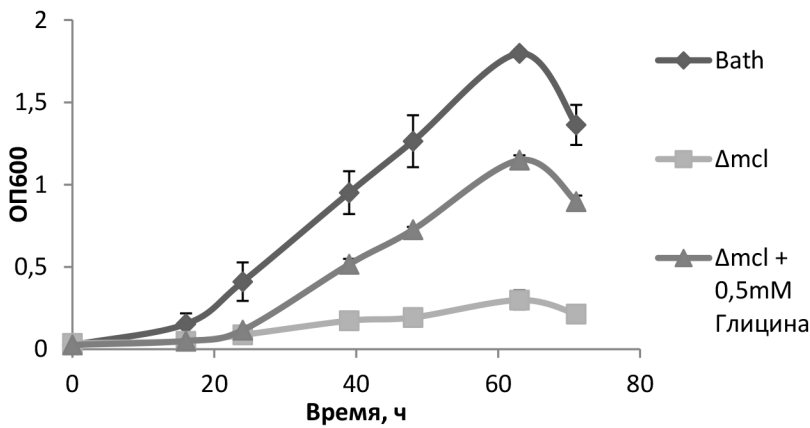


Рис. 2. Кривые роста дикого типа и мутанта *Mc. capsulatus* Bath. 1 – дикий тип Bath, 2 – Δ mtl без глицина, 3 – Δ mtl + 0,5 мМ глицина.

Таким образом, наши результаты показывают, что сериновый цикл вовлечен в метаболизм метанотрофов Ib типа, участвует во взаимопревращениях аминокислот, является дополнительным источником ацетил-КоА, но в отличие от метанотрофов Ia типа, у метанотрофов Ib типа сериновый путь не является единственным источником образования глицина/глиоксилата.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-04-00493 А

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ TRICHORMUS VARIABILIS

Е.В. Емец¹⁰⁴

Цианобактерии, ранее известные как сине-зеленые водоросли, представляют собой одну из наиболее морфологически и генетически разнообразных групп среди прокариот, способных осуществлять оксигенный фотосинтез. В настоящее время цианобактерии широко распространены в природе и являются обитателями всех экологических ниш. Нитчатые гетероцистные цианобактерии способны к клеточной дифференцировке, осуществлению азотфиксации, образованию симбиотических ассоциаций с грибами и растениями, и характеризуются исключительно большими размерами геномов (6-9 Мпн). Наличие полностью секвенированного генома модельного штамма *Trichormus variabilis* ATCC 29413, а также изученность физиолого-биохимических особенностей данного вида обуславливают перспективность биотехнологического использования ряда изолятов *Trichormus*. При наличии сотен природных изолятов полностью секвенировано лишь небольшое число геномов *Trichormus/Nostoc*, что ограничивает возможности анализа этой высокоорганизованной, широко распространенной группы цианобактерий и установления филогенетических связей между отдельными изолятами.

Целью данного исследования является полногеномное секвенирование и последующий анализ результатов для двух штаммов-изолятов, генетически родственных *T.variabilis* ATCC 29413, выделенных из различных климатических зон разных регионов земного шара. Эти данные позволят расширить знания о структуре геномов этой группы цианобактерий, а также дополнить наши представления об адаптации штаммов к определенным условиям обитания. Кроме того, полученные генетические данные и новые штаммы-изоляты могут найти применение в биотехнологии.

Исследование проводилось для штаммов, выделенных из разных мест обитания: штамм An5 выделен из ассоциации с мхом *Dicranum scoparium* прибрежной зоны в смешанном лесу Московской области, штамм An13 – из образцов гиполитного слоя грунта Восточной Антарктиды (оазис Холмы Ларсеманн). Для этих штаммов было проведено полногеномное секвенирование на платформах Illumina Miseq и Oxford Nanopore с последующей сборкой геномов «*de novo*» при помощи алгоритма Unicycler v0.5.0.

Полученные результаты показывают, что исследованные штаммы являются вариантами *T.variabilis* ATCC 29413, выделенного в 1964 г. в Миссисипи (США). Во всех случаях геном представлен одной кольцевой хромосомой (6,38 Мпн) и 4 кольцевыми плазмидами (0,36; 0,3; 0,035 и 0,027 Мпн). При анализе полученных данных в качестве референсного использовался геном *Trichormus variabilis* ATCC 29413 (GCA_000204075.1) с поправкой на 14 ранее выявленных нами однонуклеотидных ошибок секвенирования (1). Для анализа полиморфизма было проведено множественное выравнивание с использованием алгоритма Progressive Mauve.

Особый научный интерес представляет мутационная адаптация новых штаммов к экологическим условиям их среды обитания. Анализ полиморфизма показал, что относительно референсного генома штамм An5 содержит 12 однонуклеотидных замен, из них 11 замен приходится на кодирующие части генов, из которых 8 изменяют аминокислотную последовательность. Значимые мутации находятся в 5 генах, ассоциированных с мобильными генетическими элементами, а также в 2 генах, кодирующих арилсульфатазу и катионную АТФазу. Штамм An13 содержит 161 однонуклеотидную замену, из них 144 замены приходится на кодирующие части генов, из которых 101 с изменением аминокислотной последовательности. Несинонимичные полиморфизмы были обнаружены в основном в генах, участвующих в процессах метаболизма, транспорта веществ, передачи сигнала, а также в генах систем репарации/рекомбинации (табл.1).

Таблица 1.

Однонуклеотидные полиморфизмы в геномах новых штаммов по сравнению с референсным штаммом *T.variabilis* ATCC 29413.

Штамм	Белок-кодирующие гены, содержащие несинонимичные полиморфизмы					
	Гипотетические белки	Метаболическая и транспортная система	Системы репарации, рекомбинации, рестрикции-модификации	Транспозазы	Передача сигнала	Другие гены
An5	0	2	0	5	0	0
An13	9	29	5	6	18	18

Общее количество однонуклеотидных замен у штамма An13 на порядок превышает таковое у штамма An5. Возможными причинами таких различий в количестве полиморфизмов могут быть значимые замены в генах репаративных систем, обнаруженные в штамме An13, которые могли повысить естественный мутационный фон этого штамма, или более близкое филогенетическое родство штамма An5 и штамма *T.variabilis* ATCC 29413.

Результаты анализа полногеномного секвенирования штамма An5 согласуются с гипотезой о высоком уровне «внутригеномной стабильности», при этом анализ комплекса

¹⁰⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

генов систем репарации штамма An13 демонстрирует повышенную частоту возникновения мутаций в этих генах и может указывать на повышенную активность мутагенных путей репарации. Это может объяснять множественные точечные полиморфизмы в различных локусах геномов штамма An13. Полученные данные могут быть использованы для поиска оптимальных механизмов адаптаций цианобактерий к различным экологическим условиям обитания, что может быть использовано как в фундаментальной науке, так и в биотехнологии.

Список литературы:

1. Mikheeva, L. & Meshcheryakova, P. & Karbysheva, E. & Zhenavchuk, Oxana. (2017). Abstract 728: THE WHOLE-GENOME ANALYSIS OF SOME EPIPHYTIC AND ASSOCIATIVE ISOLATES OF HETEROCYSTOUS CYANOBACTERIUM ANABAENA VARIABILIS. 10.13140/RG.2.2.11582.79689.

**РАЗНООБРАЗИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
РЯДА ШТАММОВ КАРОТИНОГЕННЫХ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**

**А.А. Зайцева¹⁰⁵, Т.А. Федоренко¹⁰⁶, К.А. Шибзухова¹⁰⁷,
Д.А. Бахарева¹⁰⁸, П.А. Зайцев¹⁰⁹**

Зеленые микроводоросли являются продуцентами ценных соединений, в частности жирных кислот (ЖК), особую ценность среди которых представляют полиненасыщенные ЖК (ПНЖК). Поиск новых штаммов-продуцентов ценных ЖК является актуальной задачей для современной науки. В работе был исследован жирнокислотный состав ряда уникальных штаммов каротиногенных микроводорослей, находящихся в стрессовых условиях, вызывающих индукцию каротиногенеза, для оценки их биотехнологического потенциала.

Было проанализировано 12 штаммов: *Haematococcus rubicundus* BM 7/13, *Haematooc-cus lacustris* NAMSU T-1, *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15, *Deasonia* sp. NAMSU 934/2, *Deasonia granata* ACKU 566-06, *Chlorosarcinopsis bastropiensis* ACKU 309-04, *Bracteacoccus giganteus* NAMSU 45-02, *Ettlia carotinos* MAINX/Praha-Ac, *Coelastrella aeroterrestrica* HELL-2, *Coelastrella astaxanthina* K-1, *Pseudospongiococcum protococcoides* CALU 221, *Tetradesmus* sp. NAMSU 221a. Данные штаммы были выделены из природных местообитаний умеренных и арктических широт. В качестве контроля был выбран ранее исследованный штамм *Haematococcus lacustris* BM1. Индукцию вторичного каротиногенеза и накопления ЖК проводили с помощью комбинации стрессовых факторов: света высокой интенсивности (400 мкмоль/м²/с) и недостатка элементов минерального питания (азота). Оценку жирнокислотного состава проводили путем газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ-МС) с помощью реакции трансметилирования липидов в экстрактах, полученных методом Фолча.

Данные штаммы характеризовались, в целом, сходным составом жирных кислот. Среди них доминировали остатки пальмитиновой, α-линоленовой, олеиновой кислот и линолевой кислот, при этом максимальное относительное количество последней (39,6 %) было отмечено у штамма *B. giganteus* NAMSU 45-02. В большинстве штам-

¹⁰⁵ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

¹⁰⁶ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

¹⁰⁷ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

¹⁰⁸ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

¹⁰⁹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

мов отмечено присутствие ненасыщенных производных пальмитиновой кислоты (C16:1, C16:2, C16:3, C16:4) и стеариновой кислот. Отдельные штаммы (*H. rubicundus* BM7/13, *H. lacustris* NAMSU T1 и *C. bastropiensis* АСКU 309-04) содержали гамма-линоленовую и эйкозеновую кислоты в относительном количестве более 1%. Также в следовых количествах были обнаружены остатки кислот C14:0, C14:1, а также нескольких кислот с нечетным содержанием атомов углерода (C15:0, C15:1, C21:0). Характерной чертой изученных штаммов являлась высокая доля ненасыщенных кислот, а индекс ненасыщенности (UI) варьировал от 1,903 (у штамма *P. protococcoides* CALU 221) до 5,89 (у штамма *B. giganteus* NAMSU 45-02).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что изученные штаммы обладают потенциалом для биотехнологии как продуценты ПНЖК. Наиболее перспективным можно считать штамм *B. giganteus* NAMSU 45-02, ввиду накопления наибольшего количества линолевой кислоты и высокому значению индекса ненасыщенности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 20-74-10028.

СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА НЕУПОРЯДОЧЕННОГО ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ТИХОХОДОК DSUP (DAMAGE SUPPRESSOR) С РАДИОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

М. Зарубин¹¹⁰, Ю. Загрядская¹¹¹, Т. Муругова¹¹², А. Иваньков¹¹³,
Ю. Рыжиков¹¹⁴, Д. Соловьев¹¹⁵, И. Охрименко¹¹⁶,
А. Попов¹¹⁷, Е. Кравченко¹¹⁸

Свойства уникального стресс-протекторного ДНК-связывающего белка тихоходок Dsup (Damage suppressor), одного из самых радиорезистентных организмов *Ramazzottius varieornatus*, могут быть использованы для идуцирования устойчивости к ионизирующему излучению и окислительному стрессу в модифицированных клеточных культурах. В данной работе для объяснения протекторного механизма впервые изучались структурные свойства белка Dsup и его комплекса с модельными плазмидными ДНК. Комбинированным использованием методов малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS), спектроскопии кругового дихроизма (CD) и набором предсказательных программ была показана внутренне неупорядоченная (IDP) структура белка Dsup в растворе. Так белок содержит около 60 % неструктурированных регионов, а форма функций рассеяния, определенные размеры молекулы (R_g , D_{max}), молекулярная масса и гибкость (R_{flex}) согласуются с высоким уровнем неупорядоченности белка Dsup. Форма мономеров была охарактеризована как стержнеобразная, кроме того были получены *ab initio* модели. Влияние на внутреннюю структуру и агрегацию белка Dsup таких факторов как повышенная температура, ионное окружение и химическая денатурация были исследованы. Текущее объяснение радиопротекторного механизма

¹¹⁰ Лаборатория ядерных проблем им. В.П. Желепова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия
¹¹¹ Лаборатория ядерных проблем им. В.П. Желепова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия
¹¹² Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединенный Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия
¹¹³ Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединенный Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия
Институт проблем безопасности атомных электростанций, Киев, Украина
¹¹⁴ Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединенный Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия
Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
¹¹⁵ Физический факультет, Университет им. А. Мицкевича, Познань, Польша
¹¹⁶ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
¹¹⁷ Европейский центр синхротронных исследований, Гренобль, Франция
¹¹⁸ Лаборатория ядерных проблем им. В.П. Желепова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

базируется на неспецифичном связывании белка Dsup с ДНК, который предположительно создает физическое экранирование ДНК от повреждений АФК. В данной работе изучалось связывание белка Dsup с модельной плазмидной ДНК (5600 п.о.), которая компактизовалась при образовании комплекса. Причем связывание не вызывало существенного перестроения вторичной структуры в белке, что характерно для высокодинамических или «нечетких» комплексов внутренне неупорядоченных белков. Константы связывания Dsup-ДНК (Kd) были определены методом микроскопического термифореза (МСТ) для линеаризованных и суперскрученных форм плазмидной ДНК, более того было показано, что олигонуклеотидные формы дцДНК и оцДНК слабо связываются с белком Dsup. Полученные результаты позволяют объяснить механизм радиорезистентности с точки зрения влияния структуры неупорядоченного белка Dsup и образующегося комплекса на ДНК-протекторные свойства.

РЕКОМБИНАТНЫЕ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *NATRONOBIFORMA CELLULOSITROPHA*

А.П. Захарычева¹¹⁹, Т.В. Хижняк¹²⁰

В мире наблюдается возрастающие спрос и крупномасштабная торговля ферментами, но в России промышленная база по получению ферментов практически отсутствует. Например, в 2016 г. отечественный рынок ферментов на 95,6% состоял из импорта.

Гиперсоленые среды населены в основном экстремально галофильными археями. Внутри семейства *Halobacteriaceae* описано более 40 родов и более 150 видов. Галоархеи интересный объект для изучения различных стратегий и механизмов выживания в условиях осмотического стресса, например, особые ферменты (экстремозимы). Ферменты галофильных архей могут сохранять свою активность и выполнять биологические функции, несмотря на низкую активность воды и высокую температуру среды.

В биотехнологии потенциально могут использоваться гидролитические ферменты (или гидролазы) галоархей, так как они сохраняют свою активность в производственных специфических условиях схожих с естественной нишей организма. В представленной работе рассматриваются целлюлазы класса гликозидгидролаз (или гликозидаз), которые можно реализовать в различных отраслях – биопереработка растительного сырья, пищевая и текстильная промышленности, производство моющих средств.

Цель – изучение гидролитических ферментов гликозидаз на примере целлюлаз экстремально галоалкалофильной археи. Задачи – поиск генов, кодирующих ферменты разлагающие целлюлозу; получение клонов *Escherichia coli* и *Haloferax volcanii* со вставкой целевых генов целлюлаз из галоархеи *Natronobiforma cellulositropha* со специальными метками (His6-tag и Strep-tag, соответственно); получение высокого выхода рекомбинантных ферментов при экспрессии гена, а также чистого гомогенного ферментного препарата.

Объектом работы является галоалкалофильная архея – представитель нового рода и вида *Natronobiforma cellulositropha* AArce15. Данный организм был выделен из осадка гиперсоленого щелочного озера на аморфной целлюлозе в качестве субстрата. Штамм растет при оптимальной солености 4М Na⁺, pH 8.5–9.0 и показывает высокую гидролитическую активность на средах с аморфной целлюлозой. В геноме данного штамма были обнаружены гены гликозидаз, участвующие в разложении целлюлозы. Одним

¹¹⁹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

¹²⁰ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

из таких генов был ген ID 2642502327, кодирующий фермент из семейства GH5 (GH – glycoside hydrolase) – одного из самых крупных семейств гликозидгидролаз по данным базы CAZy. В семейство входят ферменты с различными активностями: эндоглюканаза (целлюлаза), эндоманнаназа, экзоглюканаза, экзоманнаназа, β-глюкозидаза и β-маннозидаза.

Целевой ген эндоглюканазы из галоархеи *Natronobiforma cellulositropha* AArce15 был успешно клонирован и экспрессирован в двух различных организмах *Escherichia coli* 6–3_1 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (плазмида pET-46 Ek/LIC) и *Haloferax volcanii* 3-2_1 DS70 ΔpyrE2 (плазмида pTA1392). Два разных носителя плазмиды были выбраны для сравнения свойств белка в зависимости от используемой системы экспрессии (бактериальной и архейной).

Эндоглюканазные активности рекомбинантных белков по отношению к лихенану и бета-глюкану были обнаружены во фракциях растворимых белков обоих клонов. Для проверки первичной гидролитической активности эндоглюканазы клонов *Escherichia coli* 6–3_1 и *H. volcanii* 3-2_1 проводили сверхэкспрессию (индукторы: ИПТГ для *E. coli*, 3 мМ триптофана для *H. volcanii*), а затем получали фракцию растворимых белков разрушением клеток ультразвуком. Активность фермента проверяли в буферах с лихенаном и бета-глюканом через 3 ч инкубации. Результаты опыта показали, что активность эндоглюканазы, полученной из клона *Escherichia coli* 6–3_1, ниже, чем из *Haloferax volcanii* 3-2_1 (рис. 1).

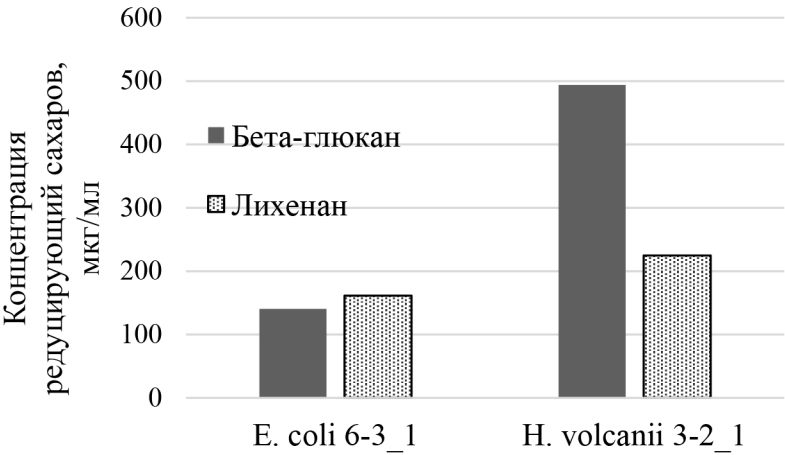


Рис. 1. Эндоглюканазная активность фермента, полученного из разных клонов. Инкубация 3 ч в буфере (2 М NaCl, Tris-HCl 50 мМ, полимер 0,4%, рН 7,5) при t=45 °С. Активность измеряли колориметрическим методом с ДНСК

Для увеличения количества эндоглюканазы из клона *H. volcanii* 3-2_1 была проведена сверхэкспрессия гена гликозидазы с использованием различных протоколов. Исходный вариант был изменен следующим образом: увеличивали концентрацию индуктора (триптофан), а также время экспрессии. Далее клетки *H. volcanii* 3-2_1 были разрушены с получением лизата, который был разделен на две фракции: растворимые

белки и остатки клеток. Эффективность протоколов оценивали по активности фермента в полученных фракциях. Результаты проверки активности гликозидазы показали (рис. 2), что увеличение концентрации индуктора слабо влияло на экспрессию гена, а увеличение времени экспрессии значительно увеличивало количество фермента.

Сравнительный анализ активности фермента на различных полимерах (бета-глюкан, лихенан, КМЦ) показал, что наибольшая активность наблюдается во фракции растворимых белков на бета-глюкане. Замечена активность гликозидазы в клеточной фракции (рис. 2).

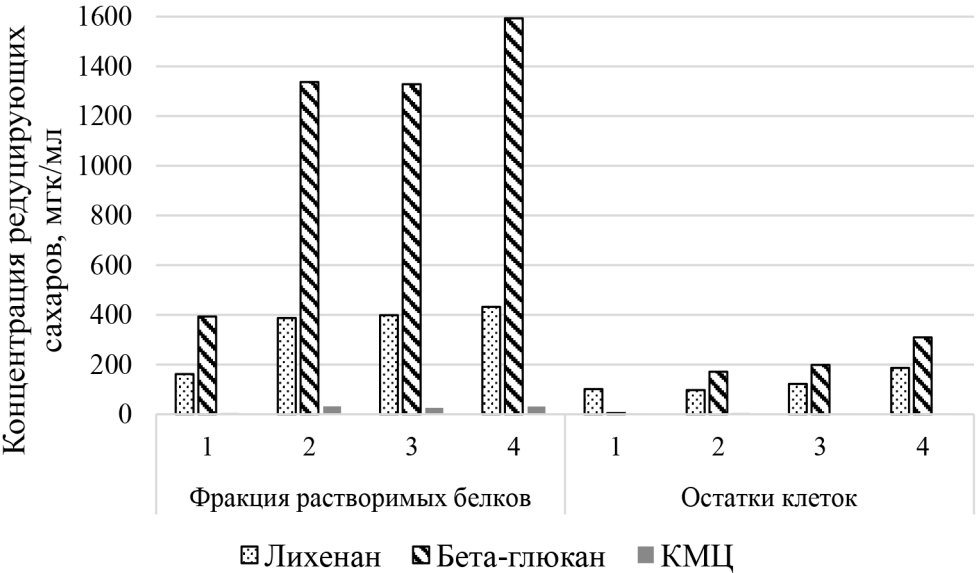


Рис. 2. Эндоглюканазная активность фермента. 1, 2, 3 и 4 – номер протокола экспрессии. Инкубация 24 ч в буфере с полимером (2 М NaCl, Tris-HCl 50 мМ, полимер 0,4%, рН 7,5) при t=45 °С. Активность измеряли колориметрическим методом с ДНСК

Заключение. Целевой ген эндоглюканазы из штамма AArce15 успешно клонирован в *E. coli* и *H. volcanii*. Для получения большего количества рекомбинантного фермента из *H. volcanii* 3-2_1 во фракции растворимых белков был разработан новый протокол сверхэкспрессии. Наибольшая активность фермента получена на бета-глюкане.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №20-14-00250.

РАЗНООБРАЗИЕ QUORUM QUENCHING БАКТЕРИЙ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ РЫБ

И.В. Злобин¹²¹, Ю.В. Зайцева¹²²

Quorum Sensing («чувство кворума», QS) системы позволяют бактериям регулировать экспрессию генов в зависимости от плотности их популяции. Системы QS состоят из двух компонентов – низкомолекулярных сигнальных молекул и рецепторных белков, с которыми они связываются. Наиболее изучены QS системы грамотрицательных бактерий, использующие в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). QS системы, основанные на АГЛ, играют важную роль в регуляции множества процессов в клетке, таких как биOLUMИнесценция, синтез антибиотиков, синтез факторов вирулентности, синтез экзополисахаридов, подвижность, передача плазмид при конъюгации и др. Поскольку QS регулирует экспрессию многих факторов патогенности, актуальным является поиск методов нарушения работы таких систем.

Процессы, так или иначе препятствующие работе QS, обычно называются Quorum Quenching («подавление кворума», QQ) (Dong et al., 2007). Стратегии контроля, основанные на механизмах QQ, являются перспективными методами, поскольку по сравнению с антибиотиками, они оказывают ограниченное селективное давление на выживание бактерий (Uroz et al., 2009). Выделяют 3 стратегии QQ: 1) нарушение синтеза сигнальных молекул, 2) разрушение сигнальных молекул, уже находящихся в среде, 3) блокада рецепторов сигнальных молекул. Один из основных механизмов QQ – ферментативная деградация сигнальных молекул QS. Выделяют три основных класса ферментов, способных к инактивации АГЛ: лактоназы, ацилазы (также называемые амидазами) и оксидоредуктазы.

Целью работы являлся скрининг штаммов микроорганизмов – активных продуцентов гидролитических ферментов, инактивирующих АГЛ.

В работе использовали коллекцию из 380 штаммов, представителей культивируемого микробиома рыб (окуня речного *Perca fluviatilis* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss*). Для обнаружения сигнальных молекул QS был использован биосенсор *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997). Данный штамм способен синтезировать пурпурный пигмент виолацеин в присутствии экзогенных молекул АГЛ с ацильной боковой цепью из четырех-восьми атомов углерода. В качестве модельного

вещества был использован N-гексаноил-L-гомосеринлактон. Штамм CV026 выращивали при 28 °C в среде LB с добавлением канамицина (20 мг/л).

Тестирование проводилось по методике (Torabi Delshad S. et al. 2018). Культуры CV026 и естественного продуцента АГЛ (*Aeromonas* sp. IR 145) выращивались отдельно на чашках с LA. Биосенсор и продуцент АГЛ были нанесены на чашку 2мя параллельными штрихами на расстоянии около 10 мм друг от друга. Между биосенсором и АГЛ-продуцентом штрихом наносился исследуемый штамм. Чашки инкубировались 48 часов при 28° C.

В результате работы были отобраны 14 штаммов микроорганизмов – активных деструкторов лактонов. Отобранные штаммы были идентифицированы по нуклеотидным последовательностям генов 16S рРНК. Среди штаммов, обладающих QQ активностью, нами были обнаружены представители 4 филумов: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*. Сравнительный анализ показал, что исследуемые штаммы относятся к родам: *Chryseobacterium*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Micrococcus*.

У штаммов с подтвержденной QQ активностью с помощью ПЦР был проведен поиск генов, ответственных за синтез ферментов, способных разрушать АГЛ: *qsda*, *quiP*, *aiiA*. Ген *qsda* был обнаружен у всех представителей рода *Rhodococcus*. Генов, аналогичных *quiP* и *aiiA* у исследованных штаммов не обнаружено.

Исследование QQ свойств штаммов показало, что АГЛ-деградирующая активность имеет ферментную природу и локализована внутриклеточно. Полученные результаты расширяют имеющиеся данные о разнообразии организмов, обладающих QQ активностью.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-20123, <https://rscf.ru/project/22-26-20123/>

Список литературы:

1. Dong Y. H., Wang L. H., Zhang L. H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications //Philosophical transactions of the Royal Society B: biological Sciences. – 2007. – Т. 362. – №. 1483. – С. 1201-1211.
2. McClellan K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology. – 1997. – Т. 143. – №. 12. – С. 3703-3711.
3. Uroz S., Dessaux Y., Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication //ChemBioChem. – 2009. – Т. 10. – №. 2. – С. 205-216.
4. Torabi Delshad S. et al. Identification of N-acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) //Journal of applied microbiology. – 2018. – Т. 125. – №. 2. – С. 356-369.

¹²¹ Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

¹²² Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТОВ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *HALOMONAS* SP. В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

А.В. Игнатенко¹²³, Т.В. Хижняк¹²⁴

Содержание хрома в Земной коре невелико, и составляет порядка $8,3 \cdot 10^{-3}$ %. Наиболее распространенными являются трех Cr(III) и шести Cr(VI) валентная форма хрома. Хром широко используется в промышленности во всем мире. Основными потребителями хрома является металлургическая и химическая промышленность. Большая его часть возвращается в биосферу с промышленными и бытовыми отходами. Вследствие токсичного воздействия хрома на живые организмы, возникает проблема очистки загрязненных территорий и переработки отходов. В большинстве случаев, работы направлены на восстановление наиболее токсичного Cr(VI), преобладающего в антропогенных отходах, в менее токсичный Cr(III). Биологические методы очистки являются одними из перспективных в этой области. Нередко загрязненные территории оказываются с повышенными показателями солености, щелочности и значений pH. Однако большинство работ в этом направлении охватывают близкие к нейтральным условия pH и нормальной солености. В связи с этим, изучение штаммов микроорганизмов, способных проводить восстановление хрома в таких условиях, является актуальной задачей на сегодняшний день.

Цель работы: проведение сравнительного анализа способности восстановления хроматов штаммами бактерий рода *Halomonas* sp. в различных условиях.

Задачи работы:

1. Сравнить восстановительную активность у различных штаммов бактерий рода *Halomonas* sp. в аэробных и анаэробных условиях;
2. Изучить влияние различных концентраций органического вещества и хроматов, температуры, солености и pH на процессы восстановления и токсическое действие хроматов на бактерий;
3. Определить локализацию и состав образующегося восстановленного хрома.

В исследовании рассмотрены 18 штаммов бактерий *Halomonas* sp., выделенные из различных сред обитания. Для культивирования штаммов Se1, Se2, Se3, Se4, Se5, SeD, Б-7, Mono и Mongol использовали минеральную среду с pH ≈ 10 , соленость по $\text{Na}^+ \approx 1\text{M}$. Штаммы AGD 1, AGD 2, AGD 3, AGD 12, AGD K5, AGD KS, AGD 8-1, AGD 8-2, AGD 8-3

культивировали на более соленой среде с pH ≈ 10 , соленость по $\text{Na}^+ \approx 2,3\text{M}$. При проведении экспериментов добавляли хромат калия K_2CrO_4 и ацетат в качестве донора электронов. Для создания анаэробных условий применяли продувку аргоном герметичных пенициллиновых флаконов. Изменение количества биомассы в исследуемых образцах отслеживали, измеряя оптическую плотность раствора (длина волны 600 нм). Морфологию клеток определяли, используя прямое микроскопирование. Определение Cr(VI) проводили, используя его реакцию с дифенилкарбазидом и последующим определением окрашенного раствора на спектрофотометре. Определение химического состава осадка проведено с использованием рентгеновского микроанализа.

В результате достоверную (восстанавливают более 25% от исходной концентрации 10 мг/л Cr(VI) за 10 дней) восстановительную активность в аэробных условиях показали штаммы AGD 8-2, AGD 8-3, Se1, Se2, Se3, Se4, Se5, SeD, Б-7, Mono и Mongol. В анаэробных условиях – штаммы AGD KS, Se1, Se2, Se3, Se4, Se5, SeD и Mono. Наибольшую скорость восстановления хромата показали штаммы Se1, Se3, SeD, Mono и Se5 в анаэробных условиях. Так, уже через сутки концентрация Cr(VI) в минеральной среде падала в 2,5–3 раза (с 10 до 2–3 мг/л Cr(VI)). Для дальнейшей работы были выбраны наиболее характерные штаммы AGD 8–2, Se1, Mono.

Для штамма Mono были определены диапазон, оптимум роста и восстановления хроматов по температуре, солености и pH. Получены зависимости между концентрацией хромата в среде, скоростью его восстановления и количеством бактериальной биомассы. Отмечены изменения в морфологии клеток в зависимости от концентрации хроматов. Установлено, что в ходе развития культуры в среде накапливается осадок, содержащий восстановленный хром (Рис. 1). Его возможный состав, основанный на результатах рентгеновского микроанализа, может быть записан следующей формулой: $\text{NaCl} + [\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ (Рис. 1).

Для штаммов AGD 8-2 и Se1 проведена оценка токсичности хромата и активности восстановительных процессов, в зависимости от содержания сложной органики. Эксперимент проводили в условиях, где скорость восстановления хроматов была максимальной. Штамм Se1 культивировали в анаэробных условиях, штамм AGD 8-2 – в аэробных. Показано, что увеличение концентрации дрожжевого экстракта в среде с 50 до 2500 мг/л ведет к увеличению скорости восстановления хроматов, а так же снижает их токсичность (Рис. 2). При концентрации дрожжевого экстракта, в 50 мг/л активное развитие штамма Se1 в анаэробных условиях наблюдалось только при концентрации Cr(VI) в 10 мг/л, полное восстановление наблюдается на 3 сутки культивирования. При начальной концентрации Cr(VI) в 20, 40 и 80 мг/л, к 14 суткам восстанавливается порядка 50%, 35% и 15% исходного хромата соответственно. При концентрации дрожжевого экстракта 2500 мг/л, полностью восстанавливается 10, 20, 40 и 80 мг/ Cr(VI) за 2, 3, 4 и 11 суток соответственно (Рис. 2). Такие же тенденции характерны и для штамма AGD 8-2. Однако в связи с тем, что восстановление хроматов для штамма AGD 8-2 является побочным процессом, скорость этого процесса значительно ниже.

¹²³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹²⁴ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

В результате исследований показано, что среди исследуемых штаммов бактерий рода *Halomonas* sp. широко представлены культуры, обладающие способностью к его восстановлению. Широкий диапазон условий, в котором возможен этот процесс, дает возможность рассматривать род *Halomonas* sp. как потенциальный источник штаммов пригодных для биоремедиации.

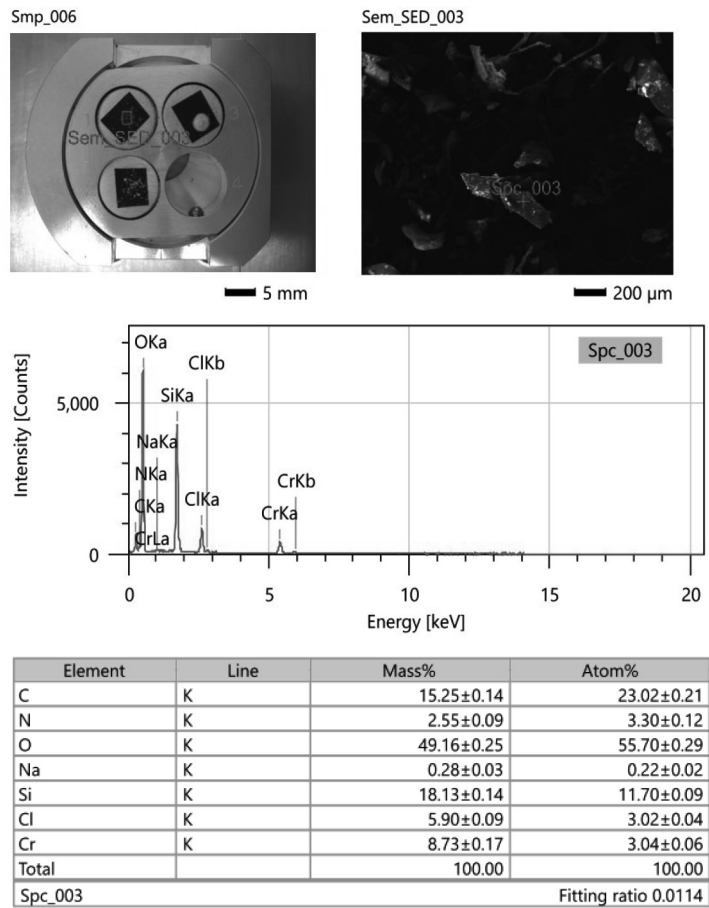


Рис. 1. Состав осадка, содержащего восстановленный Cr(III) согласно результатам рентгеновского микроанализа

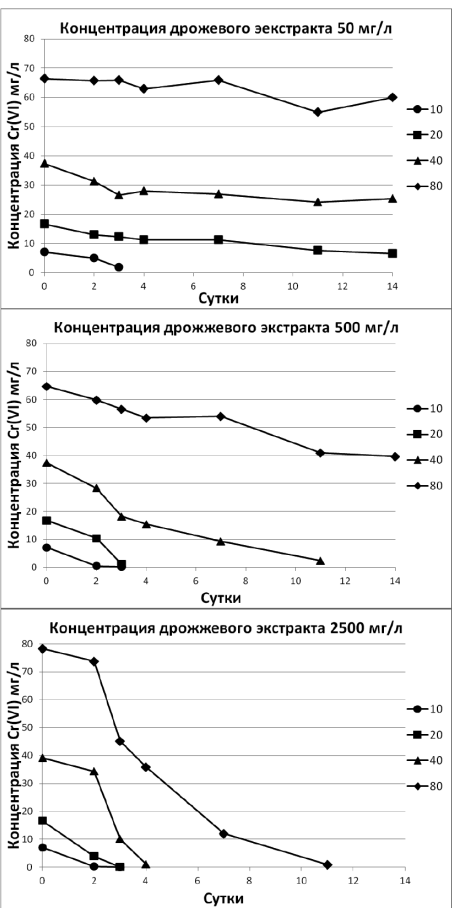


Рис. 2. Восстановление хроматов штаммом Se1 в зависимости от концентрации хроматов и дрожжевого экстракта

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ СТРУКТУРЫ КРАСНОЙ И СИНЕЙ ФОРМ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ТАЙМЕРА MRUBYFT ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

И.О. Илясов¹²⁵, А.Ю. Николаева¹²⁶, О.М. Субач¹²⁷,
Ф.В. Субач¹²⁸, К.М. Бойко¹²⁹

Открытие флуоресцентных белков (ФБ) предоставило возможность визуализации процессов, происходящих внутри клетки, как на уровне их пространственной локализации, так и во временной развертке. ФБ являются идеально приспособленными маркерами для анализа локализации клеток, клеточных органелл и белков по флуоресцентному сигналу.

Флуоресцентные таймеры клеточного цикла представляют собой ФБ, меняющие спектр флуоресценции со временем. Это свойство флуоресцентных таймеров позволяет использовать их для получения информации о длительности нахождения клетки в той или иной фазе или о точном времени вхождения в ту или иную фазу цикла. К данному классу объектов относится мономерный генетически-кодируемый таймер mRubyFT, созданный на основе ФБ mRuby и меняющий в процессе созревания спектр флуоресценции с красного на синий. В настоящей работе методом рентгеноструктурного анализа получены кристаллические структуры красной и синей форм таймера mRubyFT с разрешением 1.5 Å и 1.8 Å соответственно, а также проведен их детальный сравнительный анализ.

Данная работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20135).

¹²⁵ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия
¹²⁶ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
¹²⁷ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
¹²⁸ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия. E-mail: Subach_FV@nrcki.ru
¹²⁹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия. E-mail: kmb@inbi.ras.ru

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Н.А. Имидоева¹³⁰, Е.В. Малыгина¹³¹, М.Е. Дмитриева¹³², Т.Ю. Тельнова¹³³,
А.Ю. Бельшенко¹³⁴, М.М. Моргунова¹³⁵, В.Н. Шелковникова¹³⁶,
Н.С. Колесов¹³⁷, В.А. Емшанова¹³⁸, Д.В. Аксёнов-Грибанов¹³⁹

Исследования, посвященные возможности микроорганизмов осуществлять процессы биологической деструкции веществ различного происхождения, имеют особую актуальность. В последнее десятилетие поиск новых соединений с биологической активностью ведут среди продуцентов, выделенных из экстремальных экосистем. К таким экосистемам относится озеро Байкал. Экосистема озера характеризуется высоким процентом эндемичных организмов и специфичными условиями среды, в частности – низкой концентрацией минеральных солей и низкой температурой воды, которая, в свою очередь, влияет на высокую степень насыщенности воды кислородом. Такие условия являются экстремальными для микроорганизмов, живущих в озере Байкал. В свою очередь психрофильные микроорганизмы могут являться источником уникальных ферментов биологической деструкции с высокой стабильностью и низким температурным оптимумом. Более того, такие микроорганизмы могут иметь новые, ранее неисследованные метаболические пути, что увеличивает шансы обнаружения неизвестных природных соединений с различной биологической активностью.

Целевыми задачами настоящей работы было выделение чистых культур психрофильных бактерий, их идентификация и проведение антибиотической активности.

В ходе проведенных работ выделены психрофильные бактерии-деструкторы с поверхности отходов лесопиления (опилов хвойных и лиственных пород), погружен-

ных в озеро Байкал. Для выделения микроорганизмов были выбраны такие среды, как TSB, SG, Гетчинсона и Чапека-Докса. Стоит отметить, что среда Гетчинсона является специфической для целлюлозоразрушающих бактерий. Выделение чистых культур бактерий происходило в условиях холодильной камеры при температуре +5 °С. Было получено 338 бактериальных культур, 128 из которых выделены с питательной среды Гетчинсона, что свидетельствует о том, что данные бактерии могут являться бактериями-деструкторами. Идентификацию штаммов проводили посредством амплификации гена 16S рРНК. Обнаружены представители как широко распространенных родов, *Pseudomonas* sp. и *Arthrobacter* sp., так и представители редких родов *Janthinobacterium* sp., *Cryobacterium* sp., *Pseudarthrobacter* sp., *Pseudoclavibacter* sp. Также, в ходе проводимых исследований предположено, что данные микроорганизмы представляют большую ценность для биотехнологических разработок в области открытия новых природных соединений. Для дальнейшего проведения экстракции и последующего анализа антимикробной активности идентифицированные байкальские штаммы культивировали на питательной среде с добавлением используемых отходов лесопиления - опилок хвойных и лиственных пород. В ходе исследования, при визуальном осмотре посевов и оценке роста на питательных средах, содержащих отходы лесопиления, установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. и *Janthinobacterium* sp. способны расти на всех используемых типах сред с различной концентрацией опилок (20 г/л и 40 г/л). Напротив, штаммы *Pseudoclavibacter* sp. и *Cryobacterium* sp. не способны к росту с добавлением отходов лесопиления. Для определения антибиотической активности соединений использовали следующие тест-культуры: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Анализ антибиотической активности штаммов психрофильных микроорганизмов показал зоны ингибирования только у штаммов, культивируемых на сосновых опилках. Из них бактерицидным действием высокой степени обладали экстракты штаммов *Pseudomonas* sp. и *Janthinobacterium* sp. Такая особенность может свидетельствовать о запуске механизмов адаптации у данных штаммов при росте на выбранном типе сред.

Таким образом, показано, что выделенные в ходе исследования бактериальные изоляты способны расти на труднодеградируемом растительном сырье. Выделенные штаммы могут синтезировать при этом различные, в том числе биологически активные метаболиты. Дальнейшее изучение данных соединений создает предпосылки для создания технологий утилизации техногенного сырья с целью получения различных фармацевтических субстанций, а также их дальнейшем применении в различных отраслях промышленности.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4).

¹³⁰ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³¹ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³³ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁴ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁵ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁶ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁷ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁸ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

¹³⁹ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА БАКТЕРИИ *SERRATIA MARCESCENS* БИОГЕННЫМИ ЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Л.И. Искужина¹⁴⁰, М.А. Крючкова¹⁴¹, А.О. Рожин¹⁴²

Многие бактерии, принадлежащих к отряду Enterobacterales, обладают устойчивостью к различным антибиотикам и другим лекарственным средствам, а также способны образовывать биопленки (1). Бактерия *Serratia marcescens*, способная процветать во многих экологических нишах, включая воду, почву и воздух, может заражать растения и животных и ответственна за широкий спектр внутрибольничных инфекций, чаще всего в мочевыводящих путях, кровотоке, дыхательных путях и ранах (2). Проблема поиска альтернативных средств для устранения бактериальных инфекций достаточно актуальна. Известно, что наночастицы серебра (AgNPs) обладают хорошей терапевтической активностью, в частности, антимикробным действием в отношении широкого спектра бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (3). Противомикробное действие серебряных наночастиц, синтезированных путем биогенной самосборки с использованием мха сфагнома, исследовалось на планктонной форме условно-патогенной бактерии *S. marcescens*.

Методика. Растения *Sphagnum fallax* были взяты из природного источника – с олиготрофного болота в Ульяновской области. В лабораторных условиях растения были промыты проточной водой и высушены при комнатной температуре. Высушенные растения *S. fallax* кипятились в течение 5 минут, полученный экстракт отстаивался и остывал в стерильных условиях в течение 30 минут, после чего был снят надосажок. Емкости Falcon с надосажкой центрифугировали в течение 5 минут с частотой 2000 оборотов в минуту, после чего снова удалялся осадок. Процесс синтеза проходил в стерильных условиях при комнатной температуре – производилось смешивание экстракта сфагнома и стерильного AgNO_3 , пропорции 1:2 по объему, соответственно. Хранили реакцию смесь в темноте при комнатной температуре в течение 7 дней. Процесс протекания синтеза серебряных наночастиц контролировали по изменению цвета реакционного раствора, с прозрачного на светло-коричневый. Отмывали наночастицы трижды, центрифугированием в течение 20 минут со скоростью 13000 оборотов в минуту для осаждения их на дне емкости. Антибактериальную активность опреде-

ляли, используя количественный метод при помощи микропланшетного фотометра Multiscan FC с последующим построением кривой роста. Культивирование проводили в 96-луночной планшете, в опытные лунки вносили культуру микроорганизмов в концентрации $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл в питательной среде с добавлением наночастиц серебра в концентрациях 200, 100, 50, 25, 12.5 и 6.25 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовалась деионизированная вода, положительным контролем была культура без наночастиц. Планшет заклеивали оптически прозрачной пленкой и культивировали при непрерывном интенсивном встряхивании и измерении оптической плотности при длине волны 595 нм, каждый час в течение 48 часов. Построение кривой роста и статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2016.

Результаты. Результаты опыта приведены на Рисунке 1. *S. marcescens* имела значительную устойчивость к серебряным наночастицам, так как наблюдалось увеличение численности бактериальных колоний даже при максимальной концентрации наночастиц 200 мкг/мл.

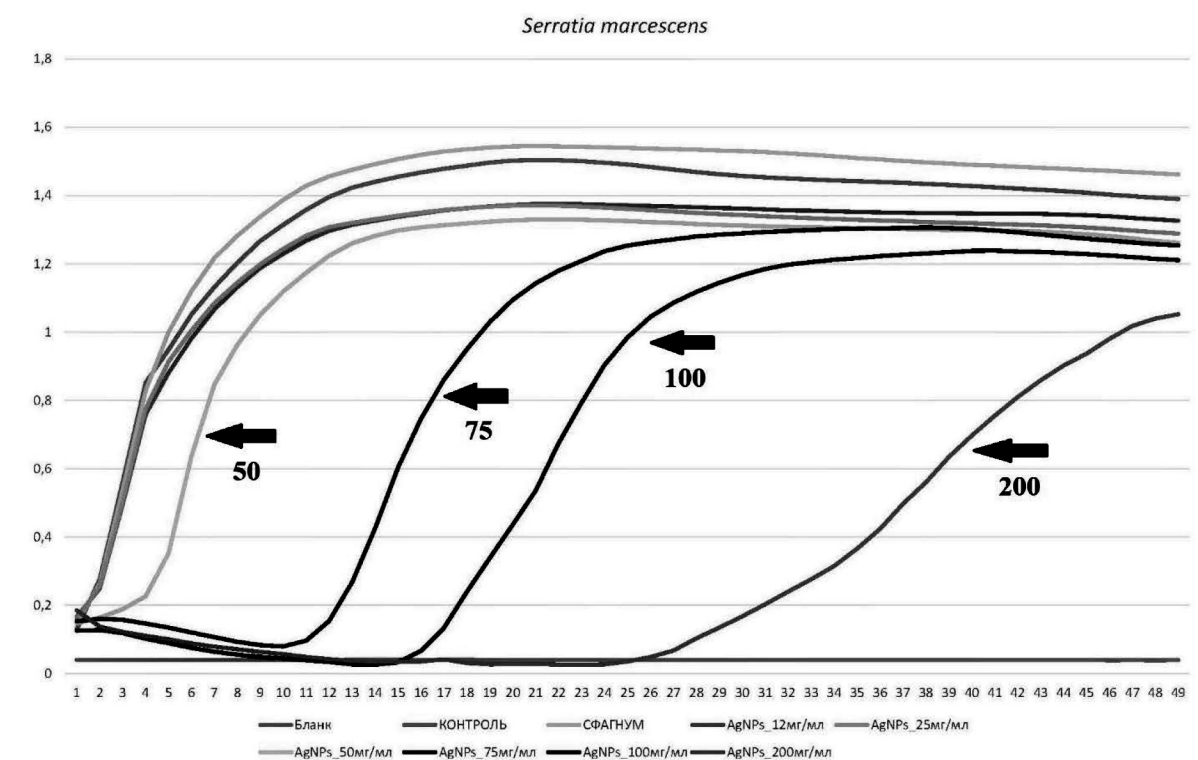


Рис. 1 Определение антибактериальной активности биогенных наночастиц серебра и экстракта сфагнома в отношении *Serratia marcescens* методом построения кривых роста. Концентрации наночастиц приведены в подписи

Однако незначительный эффект ингибирования начинался уже с концентрации 25 мкг/мл. Наблюдалась определенная задержка развития колонии, время которой зависело от концентрации AgNPs (4, 11, 16 и 24 часа). Концентрация 200 мкг/мл являлась недостаточной для полного ингибирования. Причем динамика роста (крутизна кривой

¹⁴⁰ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

¹⁴¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

¹⁴² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

в лаг-фазе) и итоговая амплитуда (максимальная численность при выходе на плато) постепенно менялись, в сравнении с контролем. Это может говорить о том, что наночастицы серебра в большой концентрации постоянно угнетают нормальный рост колонии *S. marcescens*. Высокая концентрация наночастиц угнетала рост в том числе и самых устойчивых бактерий из всей популяции. В случае с *S. marcescens*, эффективной концентрацией, по-видимому, является концентрация, от 200 мкг/мл. Экстракт сфагнома, прекурсор синтеза, антимикробного действия не оказывал.

Вывод. Было установлено, что биогенные наночастицы серебра обладают выраженным антимикробным действием в отношении бактерий *Serratia marcescens*, причем минимальная действующая концентрация – 50 мкг/мл, а эффективная концентрация полного ингибирования должна быть выше 200 мкг/мл. Эти данные могут быть основой для дальнейших исследований действия наночастиц серебра на условно-патогенные бактерии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-10034.

Список литературы.

1. Bujňáková, D., Puvača, N., & Ćirković, I. (2022). Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Enterobacterales. *Microorganisms*, 10(8), 1588.
2. Hou, J., Mao, D., Zhang, Y., Huang, R., Li, L., Wang, X., & Luo, Y. (2022). Long-term spatiotemporal variation of antimicrobial resistance genes within the *Serratia marcescens* population and transmission of *S. marcescens* revealed by public whole-genome datasets. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127220.
3. Alavi, M., Kowalski, R., Capasso, R., Douglas Melo Coutinho, H., & Rose Alencar De Menezes, I. (2022). Various novel strategies for functionalization of gold and silver nanoparticles to hinder drug-resistant bacteria and cancer cells. *Micro Nano Bio Aspects*, 1(1), 38-48.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИИ *ALCANIVORAX BORKUMENSIS*, КУЛЬТИВИРУЕМОЙ В НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ БУРОВЫХ ШЛАМАХ

И.Р. Ишмухаметов¹⁴³, Г.И. Фахруллина¹⁴⁴, А.О. Рожин¹⁴⁵

Развитие промышленности и транспортной системы напрямую зависит от доступности энергоресурсов, важнейшими из которых являются нефтепродукты. Добыча нефти неизбежно сопряжена с возможными загрязнениями природной среды в местах бурения и переработки, а также по пути ее транспортировки. Важным и актуальным вопросом является вопрос снижения токсичности и утилизации отходов нефтедобычи, таких, как буровые растворы и шламы, в которых используются многочисленные токсичные и едкие химикаты (1). Отработанный буровой раствор, и добытая вместе с ним вода являются постоянными причинами ухудшения состояния окружающей среды (2). Поэтому поиск способов его очистки является актуальной задачей. Было неоднократно отмечено, что биodeградация шламов при помощи микроорганизмов является наиболее значимым способом нейтрализации его токсического действия (3). Для этих целей была использована морская бактерия *Alcanivorax borkumensis*, в конце 1990-х годов выделенная из образцов морской воды, собранных вблизи острова Боркум (Северное море). Эта бактерия широко распространена, причем она использует нефтяные углеводороды в качестве исключительного источника углерода и энергии. *A. borkumensis* встречается в небольших количествах во всех океанах мира и в больших количествах в загрязненных нефтью водах. Эти качества, в дополнении к галофильности, был обусловлен выбор данного объекта для биodeградации нефтяной составляющей соленосодержащих буровых шламов с месторождений республики Татарстан.

Методика. Для опыта по выявлению наилучших условий для нефтедеструкции имевшиеся образцы буровых шламов (БШ) были разбавлены стерильной дистиллированной водой в различных концентрациях (1:10, 1:5, 1:3 и 1:1, по объему) и перелиты в предварительно стерилизованные стеклянные колбы на 100 мл из боросиликатного стекла Rasotherm, по 30 мл в каждую, после чего закрыты ватно-марлевыми пробками. Все стерильные работы проводились в условиях ламинарного шкафа 2 класса защи-

¹⁴³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

¹⁴⁴ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

¹⁴⁵ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ты. После разведения водой БШ в опытные колбы добавлялись суспензии микроорганизма *A. borkumensis* с оптической плотностью 08-1.0 единиц, что соответствовало 1×10^9 КОЕ. Культивация проводилась в инкубаторе при температуре 30 °С и с помешиванием на платформе, с частотой 80 оборотов в минуту. Для определения концентраций живых бактерий в опытном объеме использовался метод Коха (метод серийных разведений). Тщательно размешанный надосадок собирался в стерильных условиях и последовательно разбавлялся в 10 раз, переливанием в пронумерованные емкости Eppendorf на 2 мл, а номер, указанный на емкости, соответствовал степени в формуле: $C_n = C_0 / 10^n$, где C_0 – искомая концентрация бактерий в исходном опытном образце, n – номер на емкости, C_n – концентрация в емкости с номером n . Емкость с номером «10» содержала разведение в 10 миллиардов раз. Таким образом, при установлении концентрации C_n , вычислялась C_0 по обратной формуле: $C_0 = C_n \cdot 10^n$. При установлении концентраций после 24-часовой культивации на морском агаре в чашках Петри в нескольких емкостях, вычислялось среднее арифметическое между вычисленными на основании их значениями величины C_0 (Рисунок 1).

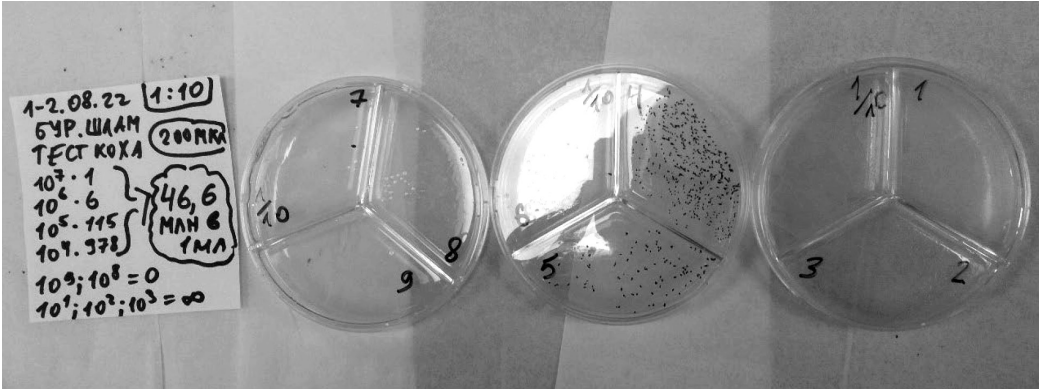


Рис. 1. Чашки Петри с помеченными колониями в процессе подсчета КОЕ по методу Коха (серийных разведений)

Результаты. В результате проведенного исследования изменения численности бактерии *A. borkumensis*, было установлено, что концентрация КОЕ с первого дня эксперимента начинала уменьшаться с 2.45 млрд в 1 мл до 890 тысяч, в случае с разбавлением «1:1», на 25 день эксперимента. Данные по динамике изменений в численности бактерий приведены на Рисунке 2. Анализ графика позволяет отметить, что численность бактерий колеблется, в зависимости от концентраций разведения шлама. С одной стороны, проявляется незначительное действие токсического компонента излишне густого раствора, с другой стороны, начинает лимитировать нехватка питательных веществ в сильноразбавленном растворе. Наиболее оптимально выглядит применение разведения 1:3, исходя из рисунка можно заключить, что концентрация бактерий стала максимальной в ряду к 25 дню, что может быть связано с достаточностью питательных веществ и относительно меньшим токсическим действием компонентов бурового

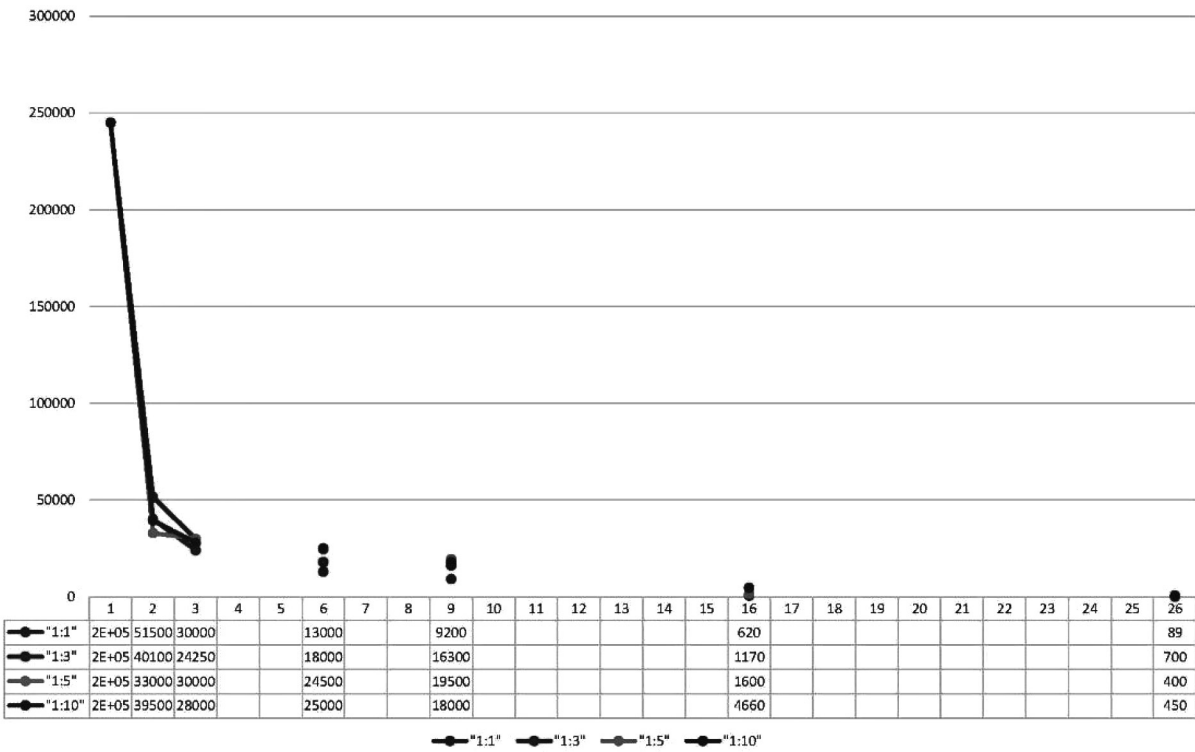


Рис. 2. Динамика изменений численности *A. borkumensis* в буровых растворах с разбавлением 1:1, 1:3, 1:5 и 1:10 в течение 25 дней

раствора. Данное исследование позволяет заключить, что бактерии способны успешно выживать в условиях бурового шлама и могут быть применены для дальнейших исследований их биоремедиационных свойств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-4393.2022.1.3.

Список литературы:

1. Edwards, W. C. (1989). Toxicology of oil field wastes. Hazards to livestock associated with the petroleum industry. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 5(2), 363-374.

2. Borah, B., & Das, B. M. (2022). A review on applications of bio-products employed in drilling fluids to minimize environmental footprint. *Environmental Challenges*, 6, 100411.

3. Deng, S., Wang, B., Su, S., Zeng, H., Chen, R., Ma, H., ... & Zhang, F. (2022). Microbial community diversity and potential bioremediation of drill cuttings in two oil reservoirs. *Petroleum Science and Technology*, 40(12), 1462-1478.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОРМОВЫХ ТРАВ

Т.В. Калашникова¹⁴⁶, З.Ю. Самойлова¹⁴⁷,
Г.В. Смирнова¹⁴⁸, О.Н. Октябрьский¹⁴⁹

По оценкам специалистов, кормовые травы левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*) и козлятник восточный (*Galéga orientális*) обладают высокой урожайностью, имеют значительную питательную ценность, содержат большое число антиоксидантов и витаминов и относительно легко культивируется в широком географическом диапазоне – Западной и Восточной Европе, Ближнем Востоке и Западной Африке. В условиях *in vitro* способности указанных кормовых трав связывать свободные радикалы и подавлять их образование подробно изучены, выявлена связь с содержанием фенольных соединений-антиоксидантов. Однако малоисследованным аспектом остается вопрос о механизмах положительного действия на организм животных, которое может осуществляться за счет воздействия на кишечную микрофлору. В связи с этим, целесообразным становится изучение биологической активности кормовых трав с использованием микробных тест-систем на основе хорошо изученного модельного организма *Escherichia coli*, который является компонентом микробиоты кишечника.

Целью настоящей работы была оценка влияния экстрактов левзеи сафлоровидной и козлятника восточного на рост и биопленкообразование в культурах лабораторного непатогенного штамма *Escherichia coli* BW25113.

Эксперименты проводились в 96-луночных полистироловых планшетах на среде М9 с добавлением глюкозы. В данной работе приводятся результаты инкубации с действующей дозой экстрактов 100 мкг сухого вещества/мл. Параметры роста (OD_{600}) и валового биопленкообразования (OD_{540}) бактериальных культур измеряли с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ (Bio-Rad, США) через 22 часа инкубации при 37°C без встряхивания. Интенсивность биопленкообразования оценивали методом окрашивания генцианвиолетом. В опытах на определение удельной скорости роста изменения OD_{600} отслеживали каждые 15 мин в течение 3 часов. Через час после начала инкубации с экстрактами добавляли 2 мМ перекиси водорода и оценивали изменения скорости роста.

В наших условиях часовая инкубация бактериальных культур в присутствии обоих экстрактов приводила к двухкратному снижению удельной скорости роста по сравнению с культурами без экстрактов (Рис 1. А, Б). Добавление H_2O_2 к культурам, не обработанным экстрактами, вызывало резкое падение удельной скорости роста, в то время как, в присутствии экстрактов культура в течение 2 часов продолжала расти со скоростью примерно в 2 раза меньше контрольной. Таким образом, в условиях пероксидного стресса обработка экстрактами оказывала выраженное антиоксидантное действие на *E. coli*.

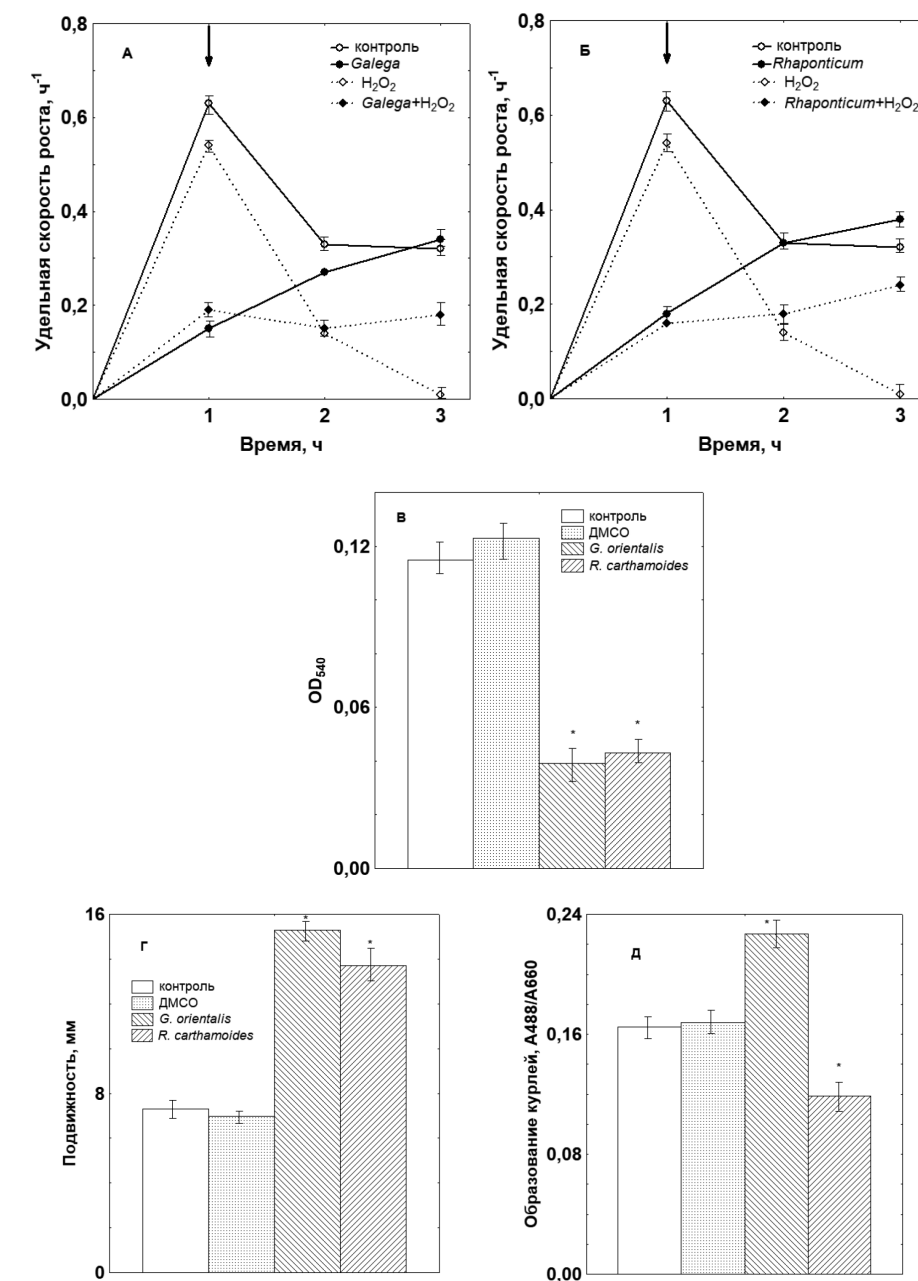


Рисунок 1. Влияние экстрактов на рост, биопленкообразование, подвижность и образование курлей в культурах *E. coli* BW25113. А, Б - удельная скорость роста при добавлении экстрактов и/или 2мМ перекиси водорода. В – Валовое биопленкообразование. Г – Подвижность. Д – Образование курлей

¹⁴⁶ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», ПФИЦ УрО РАН, Пермь

¹⁴⁷ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», ПФИЦ УрО РАН, Пермь

¹⁴⁸ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», ПФИЦ УрО РАН, Пермь

¹⁴⁹ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», ПФИЦ УрО РАН, Пермь

Ранее используемые экстракты были проанализированы методом ВЭЖХ, в результате чего среди прочих компонентов было выявлено содержание галловой и таниновых кислот и эпигалокатехин галлата, обладающих бактериостатическим действием. Известно, что замедление роста клеток приводит к повышению устойчивости к стрессовым воздействиям, что, по-видимому, и происходило в присутствии испытуемых экстрактов. Примечательно, что в присутствии экстрактов через 22 ч инкубации количество колониеобразующих единиц не изменялось по сравнению с необработанными культурами, что указывает на относительно слабое подавляющее действие экстрактов.

Замедление роста не приводило к повышению биопленкообразования. Напротив, в наших условиях обработка экстрактами снижала валовое биопленкообразование в 2.5 раза (Рис 1. В). Это совпадало с результатами тестов на подвижность, когда в присутствии экстрактов этот показатель увеличивался приблизительно в 2 раза (Рис 1. Г). В дополнительных тестах на агаре с красителем конго красным обнаружены гладкие и розовые морфотипы, что указывает на продукцию целлюлозы в составе матрикса образующихся биопленок. Повышенное на 37% образование курлей выявлено в случае инкубации с экстрактом *G. orientalis*, при этом экстракт *R. carthamoides* подавлял образование курлей на 28% (Рис. 1. Д). В совокупности наши данные указывают на способность испытуемых экстрактов оказывать значительное влияние на регуляторном уровне на бактериальный метаболизм, что несомненно вносит вклад в общее состояние макроорганизма, в рацион которого входят указанные кормовые растения.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ-Урал 19-44-590009 и госзаданием АААА-А19-119112290009-1.

МИКРОМАСШТАБНЫЙ ТЕРМОФОРЕЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ Р450 С АЗОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

И. Капранов¹⁵⁰, М. Карпова¹⁵¹, Ю. Загрядская¹⁵², И. Охрименко¹⁵³,
Т. Варакса¹⁵⁴, А. Гилеп¹⁵⁵, Н. Струшкевич¹⁵⁶, В. Борщевский¹⁵⁷

Цитохромы Р450 – широко распространенные белки, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, ненасыщенных жирных кислот и фенольных производных, а также задействованные в выведении из клетки чужеродных веществ [1]. Ранее было показано, что соединения азольного ряда, ингибирующие активность цитохромов Р450, подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* – возбудителя туберкулеза, одного из самых смертоносных заболеваний [2]. В предыдущих работах мы показали, что СYP124, СYP125 и СYP142 могут связываться и метаболизировать ряд иммуноактивных оксистеролов человека *in vitro* [3], а также участие СYP124 в метаболизме противотуберкулезного соединения, находящегося на стадии клинических испытаний [4]. Таким образом, ингибирование цитохромов Р450 является перспективной стратегией для разработки новых противотуберкулезных препаратов.

Существующие методы исследования взаимодействия цитохромов Р450 с лигандами имеют ряд ограничений. В настоящей работе мы использовали альтернативный метод – микромасштабный термофорез (MST), который не использовался ранее для изучения цитохромов Р450. Полученные кривые MST были использованы для расчета констант диссоциации СYP124 с рядом азольных соединений. Полученные значения констант сравнимы с таковыми, рассчитанными из спектрофотометрического титрования. Таким образом, MST может быть использован для изучения связывания цитохромов семейства Р450 с низкомолекулярными лигандами, особенно в тех случаях, когда классические подходы неприменимы.

¹⁵⁰ Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

¹⁵¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва

¹⁵² Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

¹⁵³ Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

¹⁵⁴ Сколковский институт науки и технологий, Москва

¹⁵⁵ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск
Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

¹⁵⁶ Сколковский институт науки и технологий, Москва

¹⁵⁷ 1Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

Данная работа была поддержана совместным исследовательским грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б20Р-061) и Российского фонда фундаментальных исследований (20-54-00005).

Список литературы:
[1] Denisov I.G. [и др.]. Structure and Chemistry of Cytochrome P450 // Chemical Reviews. 2005. № 6 (105). С. 2253–2278.
[2] Ortega Ugalde S. [и др.]. Function, essentiality, and expression of cytochrome P450 enzymes and their cognate redox partners in Mycobacterium tuberculosis: are they drug targets? // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Т. 103. № 9. 3597–3614 с.
[3] Varaksa T. [и др.]. Metabolic Fate of Human Immunoactive Sterols in Mycobacterium tuberculosis // Journal of Molecular Biology. 2021
[4] Bukhdruker S. [и др.]. Hydroxylation of Antitubercular Drug Candidate, SQ109, by Mycobacterial Cytochrome P450 //International Journal of Molecular Sciences. 2020

ЛИПОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕРМОФИЛЬНОЙ
АРХЕИ *FERVIDICOCCLUS FONTIS*

А.И. Карасева¹⁵⁸, А.Г. Ельченинов¹⁵⁹, А.А. Перевалова¹⁶⁰,
К.С. Заюлина¹⁶¹, Т.В. Кочеткова¹⁶², И.В. Кубланов¹⁶³

1ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия, 2Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия

Микробные липазы и эстеразы, катализирующие расщепление сложноэфирных связей в молекулах липидов и других органических веществ, широко востребованы на рынках ферментов для фармакологии, бытовой химии, косметического производства, синтеза топлива и работы очистных сооружений. Липолитические бактерии-продукты этих ферментов исследованы достаточно хорошо, но в настоящее время особый интерес в изучении этого свойства представляют термофильные археи, ферменты которых характеризуются высокой устойчивостью к различным условиям (рН, температура, давление, соленость и др.).

Так, термофильная хемоорганотрофная архея *Fervidicoccus fontis* 3639Fd была выделена из *in situ* накопительной культуры на трибутирине (сложный эфир глицерина и масляной кислоты). Нами было показано, что штамм 3639Fd способен гидролизовать трибутирин с образованием бутирата, углекислого газа и водорода, а также расти на других липидных субстратах (моно- и триглицеридах, пищевых маслах). Данное свойство является новым среди архей филума *Crenarchaeota*. Все имеющиеся в коллекции лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот (ФИЦ Биотехнологии РАН) штаммы *F. fontis* – Kam940^T, 4215с, 1507 и FoA-16 – были проверены на способность к росту на липидах (положительный результат получен для штаммов Kam940^T и 4215с). В геномах *F. fontis* 3639Fd и Kam940^T были обнаружены гены α/β-гидролазы, ближайшими охарактеризованными гомологами которой являются различные карбоксилэстеразы.

Качественным методом на агаризованных чашках была показана нативная липазная и эстеразная активность *F. fontis* 3639Fd, что позволяет предположить наличие у фермента способности к гидролизу липидных субстратов с длинными жирнокислотными

¹⁵⁸ ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия
Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия
¹⁵⁹ ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия
¹⁶⁰ ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия
¹⁶¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия
¹⁶² ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия
¹⁶³ ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия

остатками (до 18 атомов С). Данное свойство не характерно для эстераз термофильных архей: они тяготеют к гидролизу субстратов с короткими цепями (до 8 атомов С), и только у *Archaeoglobus fulgidus* была найдена липаза с высокой активностью по отношению к длинноцепочечным субстратам. Молекулярно-генетическими методами нами был получен ферментный препарат предполагаемой липазы Lip1 *F. fontis* 3639Fd. Дальнейшая характеристика рекомбинантного белка позволит точнее определить оптимальные условия его работы и спектр разлагаемых субстратов.

**РОСТОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫСОКОУСТОЙЧИВЫХ
К ИОНАМ МАРГАНЦА**

М.А. Касаткина¹⁶⁴, Е.В. Плешакова¹⁶⁵

Многие водные объекты различных урбоэкосистем постоянно подвергаются сильной техногенной нагрузке, в них нередко наблюдается превышение ПДК тяжёлых металлов, в том числе, марганца. В условиях антропогенеза предъявляются повышенные требования к качеству воды и содержанию в ней допустимых концентраций тяжелых металлов, что требует модернизации существующих или поиска новых экологически безопасных и экономически выгодных способов очистки, таких как сорбция и аккумуляция с помощью специализированных микроорганизмов [1].

Цель данного исследования состояла в оценке ростовых показателей микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, для выявления микробных штаммов с максимальной устойчивостью и ростом в присутствии повышенных концентраций марганца и способностью к его удалению из водной среды. В качестве объектов исследования использовались микроорганизмы, выделенные ранее из почвенных микробоценозов г. Медногорска (Оренбургская область, Россия), характеризующихся сильным техногенным загрязнением и высоким уровнем магнитности: девять микробных штаммов, выделенных с использованием селективной среды, содержащей Mn (II), и два штамма железоокисляющих микроорганизмов (*Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5) [2].

Для определения максимально-толерантной концентрации (МТК) и минимально-ингибирующей концентрации (МИК) Mn (II) оценивали способность микроорганизмов к росту на агаризованной LB-среде, содержащей Mn (II) в диапазоне концентраций от 0 до 250 ммоль/л. Для двух штаммов (55.2 и *B. megaterium* 69.5) концентрационный ряд был продолжен до 500,0. Максимальная устойчивость к Mn (II) обнаружена у микробных штаммов: 55.2 и *B. megaterium* 69.5. МТК Mn (II) для этих микроорганизмов составила 300,0 и 350,0 ммоль/л; МИК – 350,0 и 450,0 ммоль/л, соответственно.

У отобранных по результатам оценки МИК и МТК двух микробных штаммов изучали динамику роста в жидких средах: питательной LB-среде и селективной среде для марганцеоокисляющих микроорганизмов [3], содержащих возрастающие концентрации Mn (II): от 0,5 до 250,0 ммоль/л. Установлено, что наиболее активный рост штамма

¹⁶⁴ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

¹⁶⁵ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

55.2 происходил в LB-среде при концентрации Mn (II) 5,0 ммоль/л, в селективной среде – 10,0 ммоль/л. Значение оптической плотности культуральной среды увеличилось в 6,8 и 8,2 раза соответственно. Значительный рост *B. megaterium* 69.5 в LB-среде обнаруживался при концентрации Mn (II) 0,5 ммоль/л. Оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 10,4 раза. При культивировании *B. megaterium* 69.5 в селективной среде максимальный рост обнаруживался при концентрации Mn (II) 10,0 ммоль/л, оптическая плотность повысилась в 9,4 раза.

Далее оценивался рост микроорганизмов в жидкой селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II), в условиях периодического культивирования. Определение прироста биомассы микроорганизмов осуществлялось через 1, 3 и 7 сут. культивирования двумя методами: весовым (рисунок 1) и фотометрическим (рисунок 2).

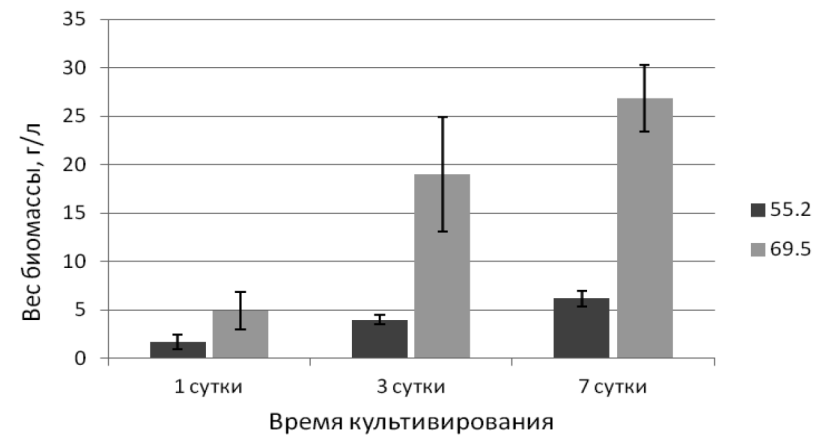


Рис. 1. Прирост биомассы по сырому весу у штаммов 55.2 и *B. megaterium* 69.5, культивируемых в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

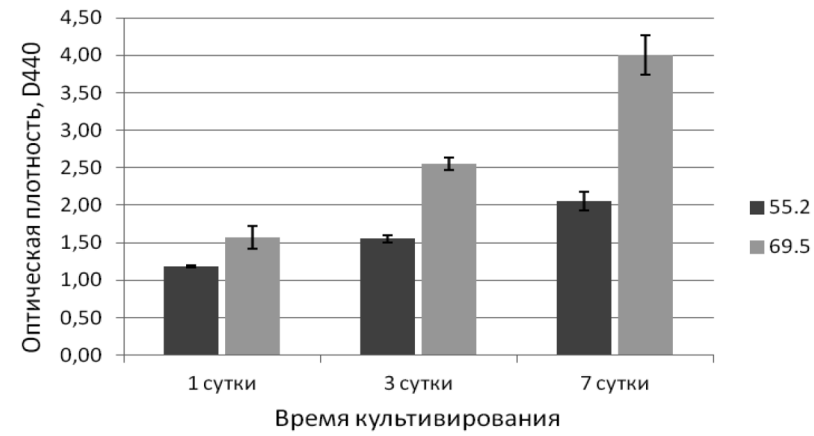


Рис. 2. Абсолютный прирост биомассы у штаммов 55.2 и *B. megaterium* 69.5, культивируемых в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

Согласно весовому методу прирост сырой биомассы через сутки культивирования штамма 55.2 составил 1,6 г/л. Через 3 сут. культивирования вес биомассы увеличился

в 2,4 раза по сравнению с первыми сутками культивирования. Через 7 сут. вес биомассы у данного штамма по сравнению с первыми сутками культивирования увеличился в 3,7 раза и составил 6,1 г/л (рисунок 1). Изменение оптической плотности через сутки культивирования штамма 55.2 произошло незначительно – на 18 % относительно исходной посевной дозы (1 ед.). Через 3 сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 1,6 раза, через 7 сут. – примерно в 2 раза по сравнению с исходной посевной дозой (рисунок 2).

Согласно весовому методу прирост биомассы *B. megaterium* 69.5 через сутки культивирования составил 4,9 г/л. Через 3 сут. вес биомассы увеличился в 3,9 раза по сравнению с первыми сутками культивирования. Через 7 сут. культивирования вес биомассы увеличился в 5,5 раза и составил 26,8 г/л (рисунок 1). Оптическая плотность через сутки культивирования *B. megaterium* 69.5 увеличилась в 1,6 раза относительно исходной посевной дозы (1 ед.). Через 3 сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 2,6 раза, через 7 сут. – в 4 раза по сравнению с исходной посевной дозой (рисунок 2).

Массовую концентрацию общего марганца в культуральной среде определяли методом с использованием окисления до перманганат-ионов согласно ГОСТ 4974-2014. Убыль марганца в среде составила 20 % через 3 сут. культивирования двух исследуемых микробных штаммов. Через 7 сут. убыль металла в среде культивирования штамма 55.2 составила 66 %, *B. megaterium* 69.5 – 50 % относительно абиотического контроля.

Таким образом, у отобранных микробных штаммов: 55.2 и *B. megaterium* 69.5 с максимальной устойчивостью к Mn (II) были обнаружены высокие показатели прироста биомассы и процентной убыли марганца из водной среды. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные микроорганизмы перспективны для применения их в биотехнологии очистки воды от избыточного содержания марганца.

Список литературы:

1. Kalaimurugan, D. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation / D. Kalaimurugan, B. Balamuralikrishnan, K. Durairaj [et al.] // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2020. – Vol. 17. – P. 1455-1462. DOI: 10.1007/s13762-019-02563-5
2. Плешакова, Е.В. Микробиологическая и биохимическая индикация почв города Медногорска / Е.В. Плешакова, М.В. Решетников, К.Т. Нгун, Е.П. Шувалова // Агрохимия. – 2016. – №1. – С. 66-73.
3. Zakharova, Yu.R. A method for cultivation of microorganisms oxidizing iron and manganese in bottom sediments of Lake Baikal / Yu.R. Zakharova, V.V. Parfenova // Biology Bulletin. – 2007. – Vol. 34. – P. 236-241. DOI: 10.1134/S1062359007030041

АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ СЕВЕРНЫХ МОРЕЙ НА ПОЛИСАХАРИДНЫХ СУБСТРАТАХ В ХОДЕ ЭКСПЕДИЦИИ «АРКТИЧЕСКИЙ ПЛАВУЧИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

А.С. Кашин¹⁶⁶

Адаптированные к холоду морские бактерии имеют не только важное значение в биогеохимических процессах, но и биотехнологический потенциал, так как способны разлагать сложные полисахаридные субстраты за счёт продуцируемых холодоактивных ферментов. Мировой науке известны различные методики получения накопительных культур продуцентов гидролитических ферментов. Одну из таких методик представил Jain с соавторами в 2017 году в их исследовании бактериальных сообществ морского залива Конгсфьорд острова Западный Шпицберген, являющегося ключевым европейским участком мониторинга биоразнообразия Арктики. По результатам исследования были сделаны выводы о том, что бактериальные сообщества вод Конгсфьорда приспособились продуцировать различные полисахаридразрушающие ферменты, в частности, в полученных бактериальных изолятах была зафиксирована активность амилазы, пектиназы, альгиназы, ксиланазы и целлюлазы, продуцируемых классом *Gammaproteobacteria* [1]. Учёными САФУ, с использованием метагеномного анализа ампликонов фрагментов гена 16S рРНК, были найдены продуценты ксиланаз из этого же класса в 2021 году, при осуществлении океанологического разреза на разных глубинах смешанных вод Карского и Баренцева морей [2]. Таким образом, резонность поиска психрофильных продуцентов полисахаридразрушающих ферментов в водах северных морей не вызывает сомнений, учитывая развитие современных молекулярно-генетических технологий и возможности уникальной научно-образовательной морской экспедиции «Арктический плавучий университет». Регулярное изучение разнообразия микроорганизмов и микробных сообществ в природных условиях территорий Арктики стало возможным и активно развивается.

Для получения накопительной культуры бактерий, продуцирующих холодоактивные полисахаридразрушающие ферменты, в качестве субстратов были взяты образ-

цы амилозы, амилапектина, а также промышленный образец сульфатной целлюлозы, прошедший специальную подготовку: комплекс полисахаридов образца подвергали биоконверсии для удаления части легкогидролизуемых углеводов [3]. После промывки и лиофильной сушки образца, состав характеризовался преобладанием целлюлозы (80 %) и наличием глюкоманнана (8 %) и ксилана (7 %).

Принципиальная схема предлагаемой методики представлена ниже на Рисунке 1.

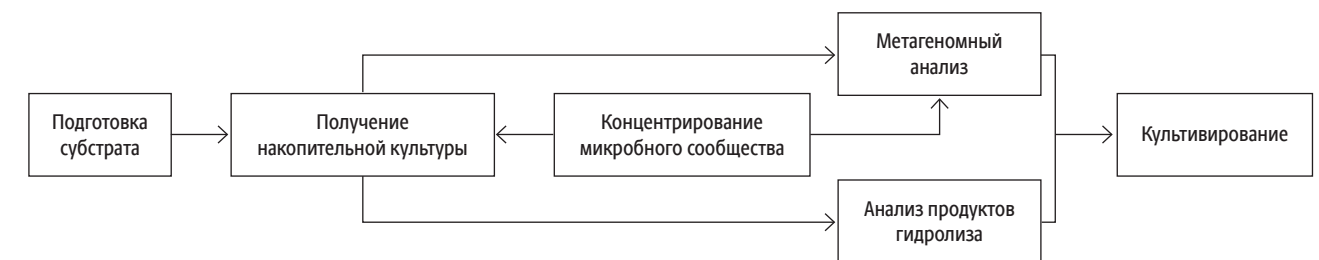


Рис. 1. Блок-схема методики получения накопительных культур микробных сообществ на полисахаридных субстратах

В процессе подготовки субстрата большое внимание уделяется его свойствам и компонентному составу с учётом примесей для дальнейшего отслеживания его изменений в процессе ферментативного гидролиза. Концентрирование микробного сообщества отобранной воды проводится методом вакуум-фильтрации не менее одного литра пробы на мембране ФМПЭС диаметром 47 мм с размером пор 0,22 мкм: одна из мембран фиксируется для последующего метагеномного анализа, а другая используется для получения накопительной культуры. Для этого подготовленный субстрат смешивается с сконцентрированным на мембране микробным сообществом в микроцентрифужной пробирке объёмом 50 мл, заполненной отобранной водой. После разделения культуральной жидкости и остаточного субстрата, используя физико-химические и ферментативные методы, производится анализ продуктов гидролиза. Посредством метагеномного анализа отслеживается изменение таксономического состава микробного сообщества до и после накопления. Исходя из полученных данных метагеномного анализа и анализа продуктов гидролиза готовятся селективные среды для получения чистых культур выбранных штаммов-продуцентов ферментов.

В ходе экспедиционной работы, организованной в рамках проекта «Арктический плавучий университет – 2022: меняющаяся Арктика», в период с 24 июня по 11 июля была апробирована часть предлагаемой методики: отобраны пробы воды и сконцентрированы микробные сообщества с 7 станций, различных по географическому положению и расположенных в акваториях Баренцева и Карского морей; на борту судна получено 28 накопительных культур и законсервировано 7 образцов сконцентрированных микробных сообществ; на нерастворённой части субстрата были найдены клетки бактерий при помощи электронного растрового микроскопа Zeiss SIGMA VP, растворимые продукты гидролиза определить не удалось.

¹⁶⁶ Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия

Метагеномный анализ ампликонов фрагментов гена 16S рРНК в образцах исходного микробного сообщества и микробного сообщества, накопленного на полисахаридных субстратах, позволит выявить специфичные таксономические группы микроорганизмов Арктических морей. В сочетании с данными по составу и структуре используемых субстратов станет возможным получение выявленных психрофильных штаммов-продуцентов амилаз, целлюлаз, ксиланаз и других гидролитических ферментов.

Список литературы:

1. Jain A., Krishnan K. P. A glimpse of the diversity of complex polysaccharide-degrading culturable bacteria from Kongsfjorden, Arctic Ocean / *Annals of Microbiology*. – 2017. – 67(2). – P. 203-214. – DOI: 10.1007/s13213-016-1252-0.
2. Ракова В. А. Исследование биоразнообразия микроорганизмов Баренцева моря с использованием метагеномного анализа ампликонов фрагментов гена 16S рРНК / Материалы III Международной молодежной научно-практической конференции «Арктические исследования: от экстенсивного освоения к комплексному развитию». – 2022. – С. 364-367.
3. Aksenov A. S., Guryanova A. A., Chukhchin D. G. et al. Biocatalysis of industrial kraft pulps: Similarities and differences between hardwood and softwood pulps in hydrolysis by enzyme complex of *Penicillium verruculosum* / *Catalysts*. – 2020. – 10(5):536. – DOI: 10.3390/catal10050536.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОДНОВРЕМЕННО ДРОЖЖЕВОГО ЭКСТРАКТА И ПРОТАТРАНОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA ETHANOLICA*

А.С. Кирюхина¹⁶⁷, Т.С. Лозовая¹⁶⁸, Е.А. Привалова¹⁶⁹, С.Н. Адамович¹⁷⁰

Для стимуляции стадии ферментации при культивировании микроорганизмов широко практикуется внесение различных активаторов роста природного происхождения, таких как кукурузный или дрожжевой экстракты, дрожжевой автолизат и др. [1]. Такой подход чаще всего оказывается эффективным. Однако активаторы роста обладают таким существенным недостатком, как высокая стоимость, поэтому их применение ведет к увеличению расходов на сырье [2].

В качестве альтернативы подобным факторам роста интересно рассмотреть применение таких соединений как протатраны (далее Пр). Это искусственно синтезируемые химические вещества, состоящие из биогенных аминов и биологически активных аналогов фитогормонов. В нескольких научных трудах уже был установлен положительный эффект при использовании данных химических веществ в качестве стимуляторов роста некоторых биологических объектов. В сравнении с кукурузным или дрожжевым экстрактами протатраны значительно дешевле, т.к. применяются и действуют в значительно более низких концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ % масс [3-5].

В связи с этим целью работы было сравнение действия дрожжевого экстракта и протатранов на количество белка в клетках микроорганизмов. В качестве последних использовали такие продуценты кормового белка как дрожжи *Candida ethanolica* ВКМ У-2300 Т, особенностью которых является использование в качестве источника углерода этилового спирта. Дрожжи культивировали на синтетической питательной среде с этанолом (1,5 % об.) в течение 40 ч. Дрожжевой экстракт вносили в количестве 2 г/л. Два протатрана – трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлорфенилсульфанилацетат и трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлорфенилсульфонилацетат – вносили в питательную среду одновременно в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ % масс. Условия культивирования были оптимальными для данного штамма. Белок определяли по методу [6]. Результаты представлены на рисунке 1.

¹⁶⁷ Иркутский национальный исследовательский технический университет

¹⁶⁸ Иркутский национальный исследовательский технический университет

¹⁶⁹ Иркутский национальный исследовательский технический университет

¹⁷⁰ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН

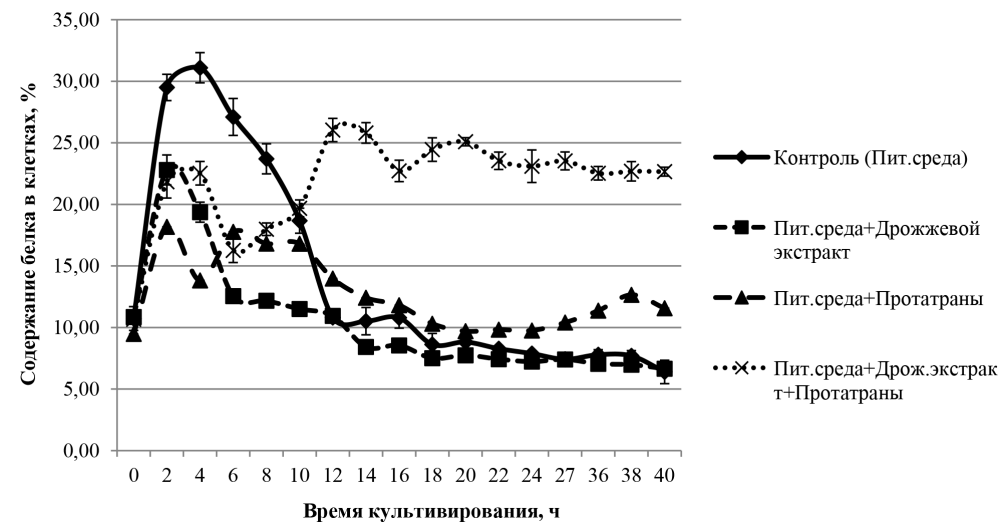


Рис. 1. Влияние различных типов стимуляторов на накопление белка в клетках дрожжей

В питательной среде (контроль) самое интенсивное накопление белка (до 31,1%, т.е. в 3,1 раза) наблюдалось через 4 ч культивирования. Далее количество белка в дрожжах стало быстро снижаться, достигнув к 12 ч его начальной величины и уменьшаясь в течение всего дальнейшего периода культивирования.

Добавление к составу питательной среды дрожжевого экстракта и протатранов вызвало менее интенсивное накопление белка в клетках к 4 ч культивирования: до 22,8% (дрожжевой экстракт), до 18,1% (протатраны). Вслед за этим количество белка после достижения максимума также быстро снижалось.

Одновременное внесение в среду для культивирования протатранов и дрожжевого экстракта не привело к более значительному накоплению белка в клетках в сравнении с контролем (до 22,5%). Однако это позволило сохранить уровень белка в клетках на уровне 22–26% на протяжении большей части культивирования дрожжей.

Известно, что белки – это необходимый компонент живой клетки. Снижение количества белка ведет к постепенному затуханию остальных биохимических процессов, и, в итоге, к снижению производительности продуцента.

Таким образом, внесение в питательную среду дрожжевого экстракта или протатранов не приводит к увеличению количества белка в клетках дрожжей *Candida ethanolica*, т.е. они не являются эффективными стимуляторами роста для данных дрожжей в данной концентрации. Однако одновременное применение дрожжевого экстракта и протатранов (в определенной концентрации) позволяет значительно продлить период активности дрожжей и, возможно, производительности.

Список литературы:

1. Нурғалиева А.Р. Оптимизация состава питательной среды для культивирования бактерий *Moraxella bovis* / А.Р. Нурғалиева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2010. Т 200. С. 123–126.

2. Пермякова Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей / Л.В. Пермякова // Техника и технология пищевых производств. 2016. № 3(42). С. 46-55.

3. Адамович С.Н. Перспективные стимуляторы повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (для получения протеина а) / С.Н. Адамович, А.П. Федосеев, Р.В. Киборт [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. № 5-1(87). С. 173–176.

4. Анганова Е.В. Использование биологически активных соединений в качестве стимуляторов роста стафилококков / Е.В. Анганова, А.Н. Мирскова, М.Ф. Савченков [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2014. Т. 125. № 2. С. 75–79.

5. Привалова Е.А. Трис-(2-гидроксиэтил) аммониевые ионные жидкости - новые биостимуляторы роста спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е.А. Привалова, Н.П. Тигунцева, С.Н. Адамович [и др.] // Вестник Иркутского государственного технического университета. 2015. № 11(106). С. 136–141.

6. Аешина Е.Н. Аминокислотный состав белков надземной части *Orthilia secunda* (L.) / Е.Н. Аешина, Ж.А. Плынская, Н.А. Величко // Химия растительного сырья. 2009. №1. С. 137–140.

УСКОРЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

М.И. Ковалева¹⁷¹, Е.В. Марьин¹⁷², М. Н. Кадукова¹⁷³, Х.С. Мустафин¹⁷⁴,
А.В. Рогачев¹⁷⁵, А.В. Мишин¹⁷⁶, В.И. Борщевский¹⁷⁷

Молекулярный докинг – это основанный на структуре белковой мишени метод, который используется в процессе разработки новых лекарственных форм. Технология является вычислительно сложной, и этап виртуального скрининга занимает значительное время, особенно при увеличении количества исследуемых малых молекул. В данном исследовании была предпринята попытка уменьшить время докинга с помощью удаления из библиотеки соединений, которые с наименьшей вероятностью дадут удовлетворительный скор докинга. Во многих работах, преследующих похожую цель, используются сложные и медленные модели машинного обучения (например, нейронные сети). В текущем подходе вместо тяжелых моделей применяются быстрые и интерпретируемые (как линейная регрессия), и применяется итеративный подход.

Для того, чтобы обучить модель машинного обучения, нужно было подобрать признаки, а также иметь обучающую выборку с известной целевой переменной – скором молекулярного докинга. Сначала требовалось отобрать мишени и библиотеки потенциальных лигандов для проведения виртуального скрининга. Были взяты структуры аденозинового A2 (A2A, PDB ID 4EIY) и каннабиноидного (CB2, PDB ID 5ZTY) рецепторов и 1,000,000 случайно выбранных соединений из библиотеки ZINC в формате SMILES (2D представление). Молекулярный докинг был выполнен в программе ICM-Pro: pdb-файлы с координатами мишеней были конвертированы в ICM-объекты, а молекулы из библиотеки соединений – в формат SDF (3D представление), кроме

¹⁷¹ Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

¹⁷² Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

¹⁷³ Университет Гренобль-Альпы, Национальный центр научных исследований, Политехнический институт Гренобля, Гренобль, Франция
Astex Pharmaceuticals, Кембридж, Великобритания

¹⁷⁴ Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

¹⁷⁵ Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

¹⁷⁶ Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

¹⁷⁷ Центр молекулярных механизмов старения и нейродегенеративных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

того, к ним были добавлены атомы водорода таким образом, чтобы заряды молекул соответствовали pH=7.0. В результате виртуального скрининга был получен столбец целевых переменных, то есть скоры молекулярного докинга. Для получения матрицы признаков с помощью библиотеки RDKit были сгенерированы бинаризованные фингерпринты Моргана с радиусом 2 и длиной 2048: таким образом, матрица имела 2048 столбцов и состояла из 0 и 1. После подготовки данных оставалось выбрать эффективную модель обучения и построить итеративный алгоритм на ее основе. Для этого набор машинных моделей обучался с помощью кросс-валидации, после чего лучшая из них была применена в итеративном алгоритме: на каждом его шаге модель обучалась на небольшом наборе молекул, для которых уже выполнен докинг, и делала предсказания для всех молекул без скор докинга. После предсказания формировался рейтинг молекул согласно предсказанному скору, и лучший 1% отправлялся на докинг для обновления обучающей выборки. Для того, чтобы определить, оптимально ли работает итеративный алгоритм, результаты его работы сравнивались с результатами полного виртуального скрининга. Под хитами подразумевались молекулы их первого процента рейтинга полного скрининга, и в качестве метрики качества алгоритма был выбран процент найденных им хитов.

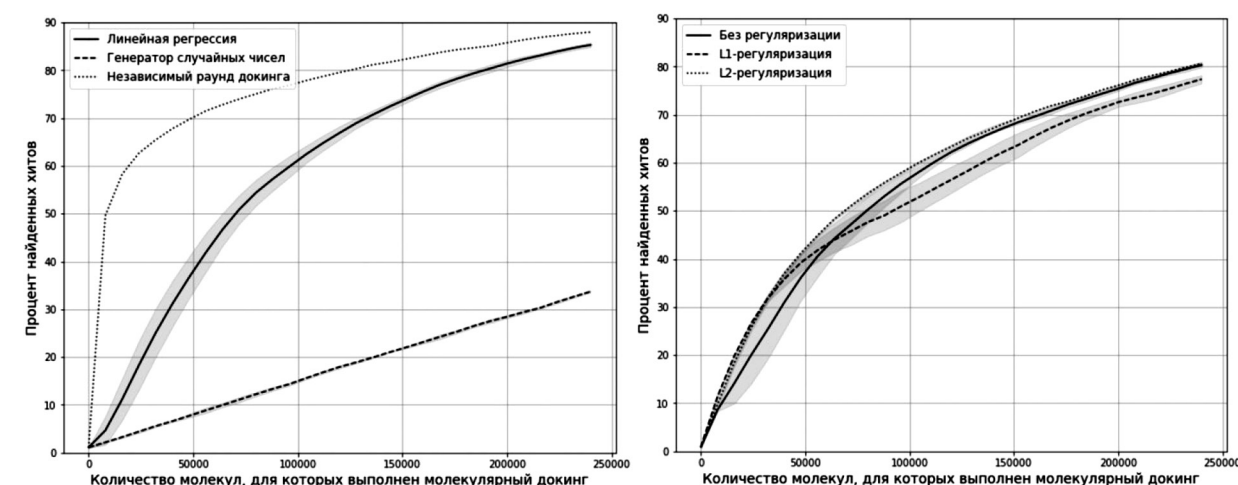


Рис. 1. Эффективность итеративного алгоритма в зависимости от модели, на которой он основан, а) для A2A; б) для CB2

Сравнение моделей показало, что линейные модели показывают высокую эффективность на тестовой выборке: они имели наиболее высокую полноту, при этом оставаясь быстрыми: обучение и предсказание занимало несколько минут. Поэтому линейная регрессия была взята в качестве модели машинного обучения в итеративном алгоритме. Для аденозинового рецептора, сравнение работы итеративных алгоритмов, основанных на линейной регрессии, независимом раунде докинга с и генераторе случайных чисел из нормального распределения показало, что построенный на регрессии алгоритм

может выделить 85% хитов после скрининга четверти библиотеки, что близко к результатам независимого раунда докинга. Для каннабиноидного рецептора, линейные модели без регуляризации и с L1- и L2-регуляризациями дали похожие результаты.

Таким образом, представленный алгоритм может ускорять молекулярный докинг в 10 раз, при этом сохраняя 60% молекул с наилучшим скором, или в 4 раза, сохраняя около 80%. Такие результаты сравнимы с результатами раннее представленных методов ([2]-[4]). Наш алгоритм работает с простым и быстрыми линейными моделями, поэтому время его работы пренебрежимо мало по сравнению с временем, которое уходит на докинг. Поэтому данный подход позволяет проводить масштабный виртуальный скрининг с доступными вычислительными ресурсами за адекватное время.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22–24–00454.

Список литературы:

1. Lyu J., Wang S., Balias T.E., Singh I., Levit A., Moroz Y.S., O'Meara M.J., Che T., Algaa E., Tolmachova K., Tolmachev A.A., Shoichet B.K., Roth B.L., Irwin J.J. Ultra-large library docking for discovering new chemotypes // *Nature*. 2019 № 7743(566). С. 224–229. DOI:10.1038/s41586-019-0917-9.
2. Gentile F., Agrawal V., Hsing M., Ton A.T., Ban F., Norinder U., Gleave M.E., Cherkasov A. Deep Docking: A Deep Learning Platform for Augmentation of Structure Based Drug Discovery // *ACS Central Science*. 2020 № 6(6). С. 939–949. DOI:10.1021/acscentsci.0c00229.
3. Yang Y., Yao K., Repasky M., Leswing K., Abel R., Shoichet B., Jerome V. Efficient Exploration of Chemical Space with Docking and Deep-Learning // *ChemRxiv*. 2021 № 2 С. 1–39. DOI:10.26434/chemrxiv.14153819.v1.
4. Berenger F., Kumar A., Zhang K.Y.J., Yamanishi Y. Lean-Docking: Exploiting Ligands' Predicted Docking Scores to Accelerate Molecular Docking // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2021 № Dd. DOI:10.1021/acs.jcim.0c01452.

СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА И ИНДУКЦИЯ ОТВЕТНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ TRITICUM AESTIVUM L. ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА AZOSPIRILLUM SOLI CC-LY788(T)

Н.К. Кондюрина¹⁷⁸, Ю.П. Федоненко¹⁷⁹

Azospirillum – род diaзотрофных грамотрицательных симбиотических альфа-протеобактерий, представляющих особый интерес для биохимических и микробиологических исследований, цель которых – получение исчерпывающей характеристики ассоциативного взаимодействия между растительным и бактериальным организмами. За последние, более чем тридцатилетние исследования, азоспириллы стали модельными объектами, на базе которых изучаются механизмы и следствия растительно-микробных ассоциативных взаимодействий [1]. С каждым годом список видов азоспирилл пополняется, описываются новые виды, большинство из которых способны к образованию биоплёнок на поверхности корней растений-хозяев. Среди растений, вступающих в ассоциацию с *Azospirillum*, преобладают злаковые, включая продуктивные сельскохозяйственные культуры. В ряде работ было показано, что азоспириллы, относящиеся к группе PGPR бактерий, осуществляют комплексное взаимодействие с растением, продуцируя широкий спектр биологически активных соединений: фитогормонов, сидерофоров, ферментов и органических кислот, включая индолил-3-уксусную кислоту. Кроме того, данные микроорганизмы способны солибилизировать фосфаты и фиксировать атмосферный азот, повышая тем самым доступность для растения ряда нутриентов, а также выступать в роли индукторов устойчивости растений к патогенам [2]. Симбиотические отношения с растениями, как и любое другое контактирование с другими организмами, непосредственно обусловлены макромолекулами поверхности бактериальных клеток, значительная доля которых представлена

¹⁷⁸ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

¹⁷⁹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

гликополимерами. Преобладающие гликополимеры *Azospirillum* – липополисахариды наружной мембраны (ЛПС) и капсульные полисахариды (КПС), являющиеся внеклеточной формой ЛПС, ассоциированной с белками-поринами. ЛПС – трёхкомпонентная макромолекула, представленная гидрофобной частью – липидом А, олигосахаридным кором и наиболее вариативной структурой – О-специфическим полисахаридом (ОПС), проявляющим свойства антигена [3].

Исследование структурных особенностей ЛПС является актуальной задачей современных исследований, также как и накопление сведений о его биологической эффективности. Различные виды азоспирилл, как и препараты их ЛПС, активно используются в качестве компонентов бактериальных удобрений, что ставит дополнительную задачу по определению их элиситорной активности и характеристике биохимических, физиологических и морфологических реакций растения-хозяина.

В настоящей работе рассмотрено влияние ЛПС *Azospirillum soli* CC-LY788(T) – типового штамма нового вида азоспирилл, обнаруженного в 2015 году в Тайване в образцах агрозёма [4] на проростки пшеницы *Triticum aestivum* L.

Препарат ЛПС получали по общему протоколу, используемому при выделении гликополимеров поверхности бактерий. Бактерии выращивали в жидкой синтетической малатной среде до экспоненциальной фазы роста. Клетки осаждали, трижды промывали физиологическим раствором, переосаждали и заменяя промывающий раствор. ЛПС экстрагировали из высушенных ацетоном клеток методом Вестфала [5] без разделения слоёв. Супернатанты объединяли, концентрировали на вакуумном испарителе (Laborota 4000 «Heidolph», Германия), подвергали диализу против дистиллированной воды, осаждали примесные белки 40% ТХУ до pH 2,7, диализовали, снова концентрировали и лиофилизировали (BenchTop 2K «VirTis», США).

Зерновки пшеницы промывали дистиллированной водой с добавлением ПАВ, стерилизовали последовательно 96% этанолом и раствором диоксида. Проращивали в стерильных условиях на чашках Петри на бумажных дисках, пропитанных жидкой питательной средой LB, затем на идентичной плотной среде в термостате при 26°C. Четырёхсуточные проростки перемещали в стерильные контейнеры и инкубировали на жидкой питательной среде для растений (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, pH 6,7). К недельным проросткам добавляли препарат ЛПС для получения концентрации 125 мг/мл в культуральной жидкости. У десятидневных проростков проводили замеры биохимических и морфофизиологических показателей.

Митотический индекс определяли по стандартной методике подсчёта при микроскопировании фиксированных препаратов кончиков корней. Было отмечено повышение митотического индекса в среднем в 1,88 раза в сравнении с контролем. Из корней проростков также был выделен водный экстракт, оптическую плотность которого измеряли при длине волны 660 нм на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия). Содержание крахмала рассчитывали по методу Takeshita [6], значительные раз-

личия в показателях контрольных и экспериментальных образцов отмечены не были.

Примечательно, что отличия биомасс контрольных и экспериментальных растений были незначительны, однако наблюдался несколько иной ответ на инокуляцию ЛПС – измерение площади поверхности листовой пластинки первого настоящего листа с помощью специализированного приложения Petiole показало увеличение площади листьев в среднем на ~ 20%.

Содержание хлорофилла и каротиноидов рассчитывали по методу Вельбурн [7]. Содержание хлорофиллов а и b в листьях изменялось незначительно, в то время как содержание каротиноидов повышалось 37,5%, что позволило предположить развитие приспособительной защитной реакции у растений, вызванной эндотоксином ЛПС.

Список литературы:

1. Turkovskaya O.V., Golubev S.N. The collection of rhizosphere Microorganisms: its importance for the study of associative plant-bacterium interactions / Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020 – V. 24(3) – P. 315–324.
2. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture / S. Gouda [et al.] // Microbiology Research. – 2018. – V. 206 – P. 131–140.
3. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components / S. Burdman [et al.] // Microbiology. – 1998. – V. 144 – P. 1989–1999.
4. *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.
5. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure / Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – V. 5 – P. 83-91.
6. 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.
7. 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.

НОВЫЕ ИЗОЛЯТЫ БАКТЕРИЙ РОДА
METHYLOMONAS, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ
КАРОТИНОИДЫ, И ИХ РОСТОВЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МЕТАНЕ

А.А. Конопкин¹⁸⁰, Е.Н. Тихонова¹⁸¹, Р.З. Сулейманов¹⁸², С.Н. Дедыш¹⁸³

Метанотрофные бактерии – группа метилотрофных микроорганизмов, специализированных на использовании метана в качестве единственного источника углерода и энергии. Эта уникальная особенность метаболизма делает метанотрофов перспективными объектами биотехнологии получения кормового белка, которая промышленно реализована и определена высокой кормовой ценностью получаемого продукта, значительными запасами природного газа и его низкой стоимостью. Основными продуцентами, ныне задействованными в производстве, являются бактерии рода *Methylococcus*. Одним из актуальных направлений развития биотехнологии получения микробного белка является поиск микроорганизмов, способных наряду с высоким выходом белка продуцировать биологически активные соединения. К таким продуктам микробного синтеза относятся каротиноиды, для которых показаны провитаминная активность, участие в окислительном обмене клетки, антиоксидантные свойства, радиопротекторные свойства, антиканцерогенное действие, усиление регенерации клеток эпителия [1, 2]. Используемые в настоящее время продуценты рода *Methylococcus* не синтезируют каротиноиды в значимых количествах.

Цель настоящего исследования состояла в поиске новых метанотрофных бактерий, синтезирующих каротиноиды, и оценке их ростовых характеристик.

Для получения изолятов метанотрофов использовали донные отложения, отобранные на мелководье безымянного озера в Краснодарском крае России (44°41'50.8»N 39°18'49.9»E). Выделение и культивирование метанотрофов осуществляли с использованием двукратно разбавленной среды NMS [3], содержащей 1 мл/л раствора микроэлементов [4]. Газовая фаза флаконов содержала 10–20% метана, а температура инкубации составляла 30–35°С. Морфологию клеток изучали методами фазово-кон-

трастной (Zeiss Axioplan 2, Zeiss, Германия) и электронной микроскопии (JEM 100CXII, Jeol, Япония). Экстракцию каротиноидов, продуцируемых штаммами, проводили этанолом с последующим переводом в смесь ацетон : метанол (7:2). Анализ экстрактов осуществляли на установке ВЭЖХ (Shimadzu, Япония) с колонкой Agilent Zorbax SB-C18 (Agilent, Калифорния, США). Количественный анализ содержания каротиноидов проводили на спектрофотометре Spectroquant Prove 300 (Merck, Германия). Оценку ростовых характеристик выделенных штаммов проводили с использованием ферментеров (GPC BIO, Франция) с геометрическим объемом 1.5 л.

Из образцов донных отложений были выделены два изолята метанотрофных бактерий: штаммы МР1 и МУ1. Изоляты представлены короткими подвижными палочками $1.10 \pm 0.03 \times 2.10 \pm 0.08$ мкм, имеющими внутрицитоплазматические мембраны I типа. На агаризованной среде изоляты формировали колонии, имеющие розовый (изолят МР1) и желтый (изолят МУ1) цвет. Штаммы МР1 и МУ1 использовали в качестве источника углерода и энергии метан и метанол, в качестве источников азота – нитриты, нитраты, аммоний и мочевины. Оптимальный рост наблюдался при pH 6.6–7.2 и температуре 30–35 °С. По результатам секвенирования гена 16S рРНК изоляты были идентифицированы как представители рода *Methylomonas*. Штамм МУ1 принадлежал к виду *M. koyatae*, тогда как штамм МР1 потенциально представлял новый вид этого рода. Анализ экстрактов клеток показал, что синтезируемые изолятами каротиноиды являются производными ликопина. Общее содержание каротиноидов в клетках штамма МР1 составляло 17.89 мкг/г, а штамма МУ1 – 171.9 мкг/г сырой биомассы.

Процессы ферментации осуществляли в ходе 2-х недельного непрерывного культивирования в нестерильных условиях с постоянной подачей минеральной среды и скоростью протока не ниже 0.15 ч⁻¹. Газо-воздушную смесь – воздух : метан – подавали в ферментер в соотношении 3:1. Растворенный кислород в культуральной жидкости поддерживали на уровне 1–20%. Температура культивирования составляла $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.0 ± 0.1 для штамма МР1 и $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 6.5 ± 0.1 для *M. koyatae* МУ1. pH поддерживали разбавленными растворами аммиачной воды и серной кислоты при перемешивании 1000 об/мин. В ходе ферментации штаммы МР1 и МУ1 показали стабильно высокую скорость роста, имели высокий выход биомассы, обогащенной каротиноидами, с содержанием белка более 60% (Таблица).

Таблица.

Ростовые характеристики и продуктивность штаммов МР1 и МУ1 при непрерывном культивировании на метане.

Характеристики	МР1	МУ
Скорость протока, ч ⁻¹	0.218±0.002	0.162±0.003
АСБ, г/л	3.26±0.41	3.51±0.41

¹⁸⁰ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия. E-mail: konopkinaalex@mail.ru

¹⁸¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

¹⁸² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

¹⁸³ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Характеристики	MP1	MY
OD ₆₀₀	9.84±0.18	12.34±0.26
Производительность, (г/л)×ч	0.68	0.63
Общее содержание белка, %	69.55±0.64	61.9±0.44
Общее содержание каротиноидов, мкг/г АСВ	25.14±2.65	48.55±0.14

Производство кормового белка из метана считается экономически выгодным при выходе биомассы не менее 5 г/л [4]. Полученные в настоящей работе результаты близки к таким параметрам, что позволяет рассматривать новые культуры в качестве потенциальных продуцентов кормового белка, обогащенного каротиноидами.

Недостатком культуры *Methylobacter* sp. MP1 была продукция значительного количества экзополисахаридов, что затрудняло проведение анализов и, ввиду нестерильного процесса, приводило к заражению посторонней микрофлорой. М. koyaiae MY1 уступал в ростовых параметрах, однако был более устойчив к контаминации и отличался более высоким уровнем продукции каротиноидов. Задачей дальнейшей работы является устранение обозначенных недостатков, подбор условий культивирования и оптимизации минеральных сред, а также усиление производственных характеристик.

Таким образом, новые штаммы рода *Methylobacter* – MP1 и MY1 – благодаря своей высокой продуктивности при выращивании на природном газе, высокому содержанию белка, синтезу каротиноидов и высоким ростовым характеристикам, могут рассматриваться как возможные альтернативные продуценты кормового белка.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список литературы:

1. Noviendri D., Hasrini R.F., Octavianti F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. J. Med. Plants Res., 2011, vol. 5 (33), pp. 7119–7131.

2. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Каротиноиды как основа для создания лечебно-профилактических средств. Российский биотерапевтический журнал, 2009, № 4 (8), С. 91–98.

3. Whittenbury R., Phillips K.C., Wilkinson J.F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing Bacteria. J. Gen. Microbiol., 1970, vol. 61 (2), 205–218.

4. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. – Москва: ГЕОС, 2001. – 500 с.

ФИКСАЦИЯ АЗОТА НЕГЕТЕРОЦИСТНЫМИ
ЦИАНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *SODALINEMA*
ИЗ МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ОЗЕР

А.И. Косякова¹⁸⁴, О.С. Самылина¹⁸⁵, Т.П. Турова¹⁸⁶

Многие экосистемы ограничены в содержании биологически доступных форм азота, поэтому фиксация азота является важной фазой глобального цикла азота. Известно, что цианобактерии вносят существенный вклад в этот процесс в морских и пресноводных экосистемах, но их роль во внутриконтинентальных минерализованных озёрах изучена слабо. Гетероцистные цианобактерии традиционно считаются основным источником поступления связанного азота в водные экосистемы, однако их массовое развитие в минерализованных озёрах происходит при относительно невысоких солёностях – до 60–70 г/л (Oren 2011; Samylina et al. 2019). При более высокой общей минерализации (до 200 г/л) среди потенциально диазотрофных цианобактерий широко распространены нитчатые негетероцистные представители рода *Sodalinema* (Samylina et al. 2021).

Для всех исследованных штаммов *Sodalinema* характерно наличие *nifH*-генов “desulfo”-типа (Samylina et al. 2021), полученных предположительно путём горизонтального переноса части *nif*-оперона от представителей *Deltaproteobacteria/Chlorobi* (Bolhuis et al. 2010). Таким образом, цианобактерии рода *Sodalinema* могут вносить вклад в фиксацию азота в высокоминерализованных озёрах, но убедительного подтверждения этого предположения в опубликованной литературе нет. Поэтому целью нашего исследования стало изучение фиксации атмосферного азота штаммами рода *Sodalinema*.

В работе были использованы штаммы Р-1104 (оз. Петуховское содовое, Алтайский край), В-353 (соленое щелочное озеро Хилганта, Бурятия), Еу-1201 (соленое щелочное озеро Эяси, Танзания), VZ-2001 (соленое щелочное озеро Второе Засечное, Курганская обл.), М-2102 (гиперсоленое озеро Малиновое, Алтайский край).

Методом ацетиленредукции было установлено, что исследуемые штаммы *Sodalinema* способны фиксировать атмосферный азот в режиме смены светового и темного периодов инкубирования (моделирование циркадного ритма «день (17 ч.)/ночь (7 ч.)»). При этом скорость ацетиленредукции в темновой фазе значительно превышает таковую

¹⁸⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

¹⁸⁵ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

¹⁸⁶ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

в световой фазе, что может свидетельствовать о разделении процессов фотосинтеза и азотфиксации во времени (Рис. 1). Однако выделение этилена в световую фазу говорит о том, что фиксация азота может происходить также параллельно с фотосинтезом. Исключением стал только штамм В-353, который не проявил активности во всех вариантах экспериментов (Рис. 1, 2 г).

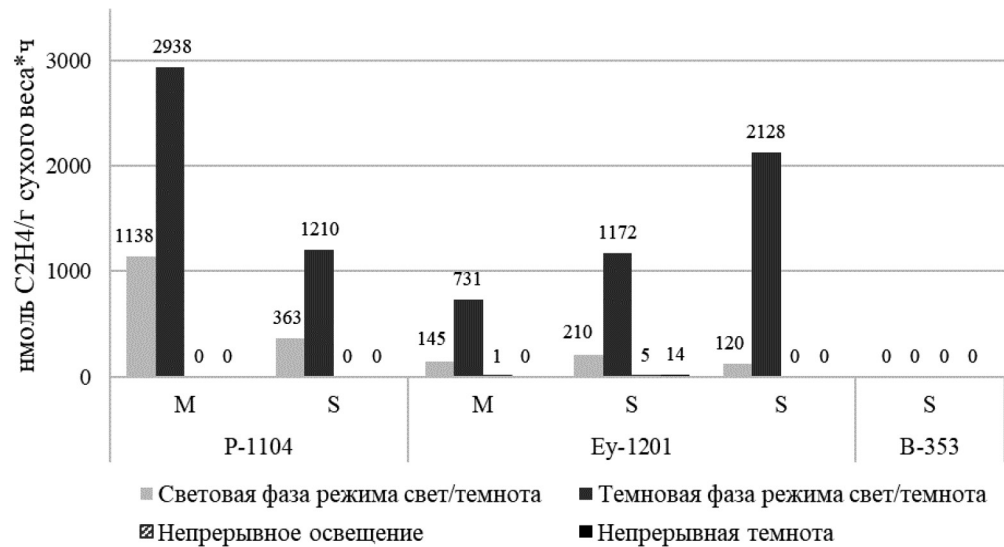


Рис. 1. Скорость выделения этилена штаммами *Sodalinema* sp. на 4 сутки эксперимента. М – среда, моделирующая условия содовых озер, S – соленых щелочных

Добавление ингибитора ФС II диурона (DCMU) практически полностью подавляло процесс ацетиленредукции. Внесение 2 ммоль/л сульфидов в интактные культуры *Sodalinema* не влияло на динамику выделения этилена, при этом добавление сульфидов в культуры, предварительно заингибированные диуроном, индуцировало выделение этилена в режиме смены световой и темновой фаз (Рис. 2 а-в). Этот результат свидетельствует о способности штаммов *Sodalinema* переключаться в дневное время с оксигенного на сульфид-зависимый аноксигенный фотосинтез (Grim, Dick 2016). В минерализованных озёрах представители рода *Sodalinema* обитают в благоприятных для этого условиях: с пониженным содержанием кислорода (высокая солёность) и/или повышенным содержанием сульфидов (бентосные микробные сообщества).

Сульфид окисляется ферментом сульфид:хинон оксидоредуктазой [EC:1.8.5.4], которая передаёт электроны на ФС I. Поиск в аннотированных белках, закодированных в геномах *Sodalinema* sp. P-1104 и *S. gerasimenkoe* В-353 подтвердил его наличие у штамма P-1104 с высокой азотфиксирующей активностью и не выявил его у штамма В-353. Вероятно, именно в этом кроется одна из причин неспособности этого штамма фиксировать атмосферный азот во всех экспериментальных условиях, изученных нами.

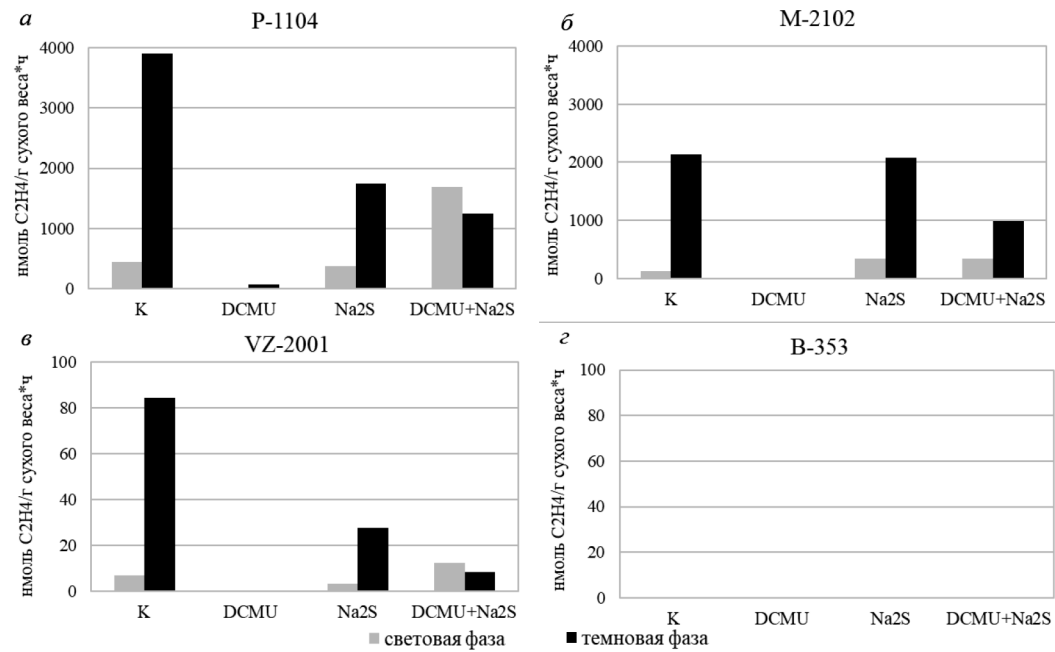


Рис. 2 Скорость выделения этилена штаммами *Sodalinema* sp. после добавления при добавлении диурона (DCMU) и сульфидов в режиме смены световой и темновой фаз. Измерения проводили на вторые сутки после добавления сульфидов. К – контроль (вариант без добавления DCMU и/или сульфидов)

Список литературы:

1. Bolhuis, H., Severin, I., Confurius-Guns, V., Wollenzien, U. I., & Stal, L. J. Horizontal transfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* //The ISME journal. – 2010. – V. 4. – № 1. – P. 121-130.

2. Grim S. L., Dick G. J. Photosynthetic versatility in the genome of *Geitlerinema* sp. PCC 9228 (formerly *Oscillatoria limnetica* ‘Solar Lake’), a model anoxygenic photosynthetic cyanobacterium //Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1546.

3. Oren A. Diversity of halophiles //Extremophiles handbook. – 2011.

4. Samylina O.S., Namsaraev Z.B., Grouzdev D.S., Slobodova N.V., Zelenev V.V., Borisenko G.V., Sorokin D.Y., 2019. The patterns of nitrogen fixation in haloalkaliphilic phototrophic communities of Kulunda Steppe soda lakes (Altai, Russia). FEMS Microbiol Ecol, 95(11): fiz174, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz174>

5. Samylina, O. S., Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., Starikov, A. Y., Sukhacheva, M. V., Dziuba, M. V., & Tourova, T. P. Ecology and biogeography of the ‘marine Geitlerinema’ cluster and a description of *Sodalinema orleanskyi* sp. nov., *Sodalinema gerasimenkoe* sp. nov., *Sodalinema stali* sp. nov. and *Baaleninema simplex* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) //FEMS Microbiology Ecology. – 2021. – V. 97. – № 8. – P. fiab104.

ВКЛАД ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *GORDONIA* В БИОРЕМЕДИАЦИЮ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.Н. Кочаровская¹⁸⁷, Я.А. Делеган¹⁸⁸

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и тяжелые металлы (ТМ) являются одними из приоритетных загрязнителей почвы, зачастую одновременно комплексно воздействующих на экологическое состояние территории. Известно, что бактерии рода *Gordonia* способны утилизировать широкий спектр поллютантов различной структуры в том числе и ПАУ. Также у некоторых видов обнаружена способность к секвестрации ТМ. Благодаря чему *Gordonia* обладают большим потенциалом для восстановления загрязненной почвы (Basik et al., 2021).

Для исследования были выбраны 4 площадки мониторинга на территории Ростовской области. Первая площадка (Pers) – фоновая территория, расположенная в пределах ООПТ «Персиановская заповедная степь». Площадки под номером 74Ata и 57Ata располагаются на территории высохшего озера Атаманское, которое многие годы являлось резервуаром для химических отходов предприятия по производству каучука. Площадка 4Nov находится под непрерывным воздействием аэротехногенных выбросов предприятия первого класса опасности – Новочеркаской ГРЭС.

Пробы отбирали в соответствии с ISO 10381-1 (2002) в октябре. ДНК из образцов выделяли с помощью набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, UK) по стандартному протоколу. Секвенирование выполнено с использованием платформы NextSeq 500 (Illumina) в ФЦКП НО КФУ (Казань, Россия). Биоинформатическая обработка проводилась при помощи ПО BMTagger (Rotmistrovsky, Agarwala, 2011), Trimmomatic ver. 0.38 (Bolger et al., 2014), Spades ver. 3.15.2 (Nurk et al., 2013) и сервисов MG-RAST (Meyer et al., 2008) и Kaiju (Menzel et al., 2016).

Физико-химический анализ почвы (Gorovtsov et al., 2021) показал, что на территории площадок Pers и 4Nov почвы представлены черноземами обыкновенными карбонатными тяжелосуглинистыми, а на территории площадок 74Ata и 57Ata – хемоземами. В фоновой почве содержание лабильных форм ТМ и ПАУ не превышает установленные нормы, а в находящихся под многолетним антропогенным прессингом выявлено превышение ПДК всех представленных лабильных форм ТМ. Суммарное содержание ПАУ на данных площадках более чем в 10 раз превышает фоновое значение.

С помощью метагеномного профилирования в пробах обнаружено 14 фило-типов, относящихся к роду *Gordonia*. Самой таксономически разнообразной является фоновая площадка, где найдены все 14 фило-типов; менее разнообразной является площадка 74Ata – 6 фило-типов. В 57Ata и 4Nov пробах выявлено равное количество фило-типов рода *Gordonia*. Среди них представители, у которых ранее была обнаружена способность к деструкции поллютантов: *Gordonia ajococcus*, *Gordonia polyisoprenivorans* VH2, *Gordonia phthalatica*, *Gordonia* sp. YC-JH1, *Gordonia rubripertincta*, *Gordonia* sp. 135 и *Gordonia* sp. KTR9 (Hu T. et al., 2022). В двух почвенных пробах (57Ata и 4Nov) обнаружены вирусы рода *Gordonia*, что косвенно указывает на активное жизнеспособное состояние *Gordonia* на территории этих двух площадок.

Корреляционный анализ Спирмена (Daniel, 1990) показал высокую отрицательную зависимость распределения *Gordonia alkanivorans* в пробах от содержания в почве ПАУ, Ni, Cd и Cr ($r=-0,95$; $r=-0,84$; $r=-0,85$ и $r=-0,75$ соответственно, $p<0,05$), у *Gordonia insulae* и *Gordonia* sp. YC-JH1 с содержанием Ni в среде ($r=-0,89$ и $r=-0,83$ соответственно, $p<0,05$) и у *Gordonia* sp. KTR9 с содержанием Cd ($r=-0,92$, $p<0,05$). Высокая положительная корреляция найдена только у *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 с содержанием Cr в почве ($r=0,82$, $p<0,05$). Данные результаты указывают на угнетающее воздействие ТМ на некоторых представителей рода, что может являться лимитирующим фактором.

В сообществах доля *Gordonia* невелика – не более 0,2% от общего количества таксонов и 0,6% от *Actinobacteria*. При сравнении количества представителей рода *Gordonia* с другими известными деструкторами поллютантов, наиболее представленными в сообществах (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Azoarcus* и *Variovorax*) выявлено, что большая доля прочтений принадлежит *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, но не превышает 1%.

Shotgun анализ позволил изучить функциональный потенциал представителей рода *Gordonia* в почвенных микробиомах. Поиск генов катаболизма ПАУ, принадлежащих *Gordonia*, выявил гены: *narR1*, *narR2* (naphthalene degradation regulator protein), *rub1* (rubredoxin), *narAa* (naphthalene dioxygenase large subunit), *narB* (cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase), *narC* (aldolase), которые относятся к полному оперону катаболизма ПАУ у рода длиной 9434 баз. Количество выровненных прочтений в пробах варьирует от 128 до 707, что составляет от 4 до 20% от всех найденных прочтений, соответствующих генам катаболизма ПАУ. Поиск генов, ответственных за резистентность к ТМ у *Gordonia*, выявил гены устойчивости к Cr – *chr* (*chrA* – chromate resistance). Следовательно, представители рода вносят большой вклад в качестве деструкторов ПАУ, но влияние ТМ отрицательно сказывается на их функционировании и доминировании в сообществах.

Таким образом, микроорганизмы рода *Gordonia* представляют минорную часть сообщества, но обладают значительным таксономическим разнообразием и функциональным потенциалом. Находясь в стрессовых условиях из-за слабой устойчивости к загрязнению тяжелыми металлами, они могут играть роль биоремедиаторов загряз-

¹⁸⁷ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Россия

¹⁸⁸ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Россия

ненных почв только в совокупности с другими микроорганизмами, способных нивелировать негативное воздействие на клетки *Gordonia*.

Работа выполнена при поддержке РНФ № 22-74-10082.

Список литературы:

1. ISO 10381–1, (2002). Soil quality. Sampling. Part 1. Guidance on the design of sampling programs.
2. Daniel R. Spearman rank correlation coefficient / Daniel R., Wayne W. // Applied Nonparametric Statistics (2nd ed.). Boston: PWS-Kent. – 1990. – P. 358-365.
3. Basik A. A., Sanglier J-J., Yeo C. T. [et al.] / Microbial Degradation of Rubber: Actinobacteria // Polymers (Basel), 2021. V. 13. 27p.
4. Hu T., Yang C., Hou Z. [et al.] / Phthalate Esters Metabolic Strain *Gordonia* sp. GZ-YC7, a Potential Soil Degradator for High Concentration Di-(2- ethylhexyl) Phthalate // Microorganisms, 2022. V. 10. 16p.
5. Gorovtsov Andrey The effect of combined pollution by PAHs and heavy metals on the topsoil microbial communities of Spolic Technosols of the lake Atamanskoe, Southern Russia / Gorovtsov Andrey, Demin Konstantin, Sushkova Svetlana, Minkina Tatiana, Grigoryeva Tatiana, Dudnikova Tamara, Barbashev Andrey, Semenov Ivan, Romanova Valeria, Laikov Alexander, Rajput Vishnu, Kocharovskaya Yulia // Environ Geochem Health. – 2021. - Vol. 29 (<https://doi.org/10.1007/s10653-021-01059-x>).
6. Rotmistrovsky K., Agarwala R. BMTagger: Best Match Tagger for Removing Human Reads from Metagenomics Datasets. – 2011. (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/bmtagger/>)
7. Bolger A. M. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data / Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. // Bioinformatics. – 2014. – btu170.
8. Nurk S. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads / Nurk S., Deng M., Jiang R., Sun F., Zhang X. et al. // Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science. – 2013. – Vol. 7821. (https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0_13)
9. Meyer F. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes / Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. et al. // BMC Bioinformatics. – 2008. – Vol.9. – No. 386.
10. Menzel P. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. / Menzel P., Ng K.L., Krogh A. // Nat. Commun. – 2016. – Vol.7. – No. 11257

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКАНОВ БАКТЕРИЙ РОДА *HALOMONAS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ СОЛИ ОЗЕРА САСЫК-СИВАШ

М.С. Кузина¹⁸⁹, Е. Н. Сигида¹⁹⁰, В. С. Гринев¹⁹¹,
М. С. Кокоулин¹⁹², Ю. П. Федоненко¹⁹³

Поверхностные полисахариды бактерий являются полифункциональными и физиологически значимыми, поскольку выполняют барьерную, протекторную и резервную функции, могут быть задействованы в регуляции процессов роста и развития микроорганизмов. Микробные гликополимеры, благодаря своей уникальной структуре и физическим свойствам, широко применяются в медицине, фармацевтической и пищевой промышленности. Многие галофильные бактерии, продуцирующие полисахариды, представляют большой интерес для биотехнологии и биопроизводства благодаря способности утилизировать органические отходы, устойчивости к высокому содержанию солей, алкалофильности и др. Эти свойства значительно упрощают соблюдение асептических требований при культивировании бактерий, что существенно снижает экономические затраты на получение целевого продукта. В связи с этим исследования галофильных бактерий как новых перспективных продуцентов биополимеров, в том числе и полисахаридов, являются актуальными.

Целью данной работы являлось выделение граммотрицательных галофильных бактерий из образцов соли озера Сасык-Сиваш (Крым, Россия), собранных летом 2021 года на соляном пляже у села Прибрежное, с последующей характеристикой их липополисахаридов.

Изоляты галофильных бактерий выделяли с использованием модифицированной среды S-G (Sehgal and Gibbons, 1960), содержащей 3% сахарозы, 3% глюкозы и 5, 10, 15 или 20% NaCl. Для получения накопительной культуры 10 г соли добавляли в 90 мл жидкой питательной среды S-G, инкубировали при 30 и 37°C в течение 3–7 суток на ротационном шейкере (200 об/мин). Затем из аликвот последовательных разведений накопительной культуры делали высевы на плотные среды S-G того же состава и инкубировали при 30 и 37°C в течение 2 недель. Отбирали изоляты с мукоидными

¹⁸⁹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

¹⁹⁰ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

¹⁹¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

¹⁹² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН, Владивосток, Россия

¹⁹³ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

колониями. Чистоту культур контролировали с помощью световой микроскопии. Хранение отобранных микробных культур осуществляли при -70°C в среде S-G, содержащей 20% глицерина.

Идентификацию каждой изолированной культуры микроорганизмов осуществляли на основании данных анализа культурально-морфологических и биохимических свойств, а также данных секвенирования генов 16S рРНК.

В результате были выделены шесть изолятов грамотрицательных бактерий, которые по совокупности охарактеризованных свойств были отнесены: RU1S2KR, RU1S23KR, RU1S25KR, RU1S26KR к *Halomonas fontilapidosi*, а RU1S4KR и RU1S5KR – к *H. sediminicola*. Из бактерий всех штаммов с использованием экстракции натриевой солью ЭДТА были получены липополисахариды (ЛПС) – преобладающие компоненты внешней мембраны, структура которых является признанным хемотаксономическим критерием грамотрицательных бактерий. По данным электрофореза в денатурирующих условиях с додецил-сульфатом натрия в 15% полиакриламидном геле с последующей визуализацией продуктов разделения красителем на основе нитрата серебра все ЛПС были представлены S-формой, т.е. содержащей липид А, коровый олигосахарид и О-специфический полисахарид.

Все штаммы культивировали в жидкой среде S-G (500 мл) с добавлением 5 или 10% NaCl (по результатам оптимизации) в литровых колбах Эрленмейера в течение трех суток при 30°C в условиях постоянного перемешивания. Бактерии осаждали центрифугированием ($3500\times g$, 40 мин), дважды промывали 0.15 М NaCl, после чего высушивали ацетоном и мелко диспергировали. Из ацетонового порошка клеток (~ 4 г) выделяли ЛПС модифицированным водно-фенольным методом Вестфалля без разделения фаз, диализовали, концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 («Heidolph», Германия) и лиофилизировали на приборе BenchTop 2K («VirTis», США). ЛПС гидролизывали 2 %-ной $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (100°C , 2 ч). Осадок липида А удаляли после центрифугирования ($12000\times g$, 20 мин), а водорастворимую часть фракционировали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50 (55×1.5 см) («GE Healthcare», США) в пиридин-ацетатном буфере (рН 4.1). Элюцию контролировали с помощью дифференциального проточного рефрактометра LKB 2142 (Швеция). Определение моносахаридного состава и установление абсолютных конфигураций сахаров проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов и ацетилированных октил-гликозидов на газовом хроматографе GC-2010 («Shimadzu», Япония). Структуры повторяющихся звеньев О-специфических полисахаридов (10–15 мг) устанавливали с использованием одно- и двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Спектры регистрировали на приборе Avance-III («Bruker», Германия) при 37°C в 99.95 % D_2O (0.6 мл) используя ацетон (δC 31.45, δH 2.225) в качестве внутреннего стандарта.

В результате проведенных исследований было показано, что О-полисахариды трех штаммов являются линейными полимерами D-маннозы, структура повторяющихся звеньев которых представлена: $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow]$ для штаммов RU1S5KR, RU1S23KR и $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow]$ для штамма RU1S25KR.

Для штамма RU1S26KR было показано, что повторяющееся звено его О полисахарида представлено линейным тетрасахаридом следующей структуры $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]$.

Следует отметить, что р. *Halomonas* является типовым для большого семейства Halomonadaceae и включает в себя сто шестьдесят два вида (<https://lpsn.dsmz.de/genus/halomonas>). Известно, что бактерии р. *Halomonas* являются продуцентами биологически активных полимеров, в том числе и полисахаридов. Однако данные о структуре гликополимеров этих бактерий малочисленны. Структура экстраклеточного полисахарида установлена для единственного штамма *H. saliphila* LCB169(T).

Структуры О-полисахаридов либо экстраклеточных полисахаридов были охарактеризованы только для ограниченного числа штаммов семи видов данного рода. Для штаммов *H. pantelleriensis* 21 и *H. magadiensis* было показано, что повторяющиеся звенья О полисахаридов являются разветвленными гетероолигосахаридами и состоят из аминсахаров и уроновых кислот, в то время как О-специфический полисахарид штамма *H. stevensii* S18214 состоял из разветвленного галактоглюкана, а у *H. smyrnensis* AAD6 – разветвленного D-фруктана. Среди О-специфических полисахаридов галомоносов были выявлены и L-рамнаны. Показано, что повторяющееся звено О-полисахарида *H. alkaliantarctica* CRSS представлено линейным трисахаридами следующей структуры: $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$, а у *H. ventosae* RU5S2EL, выделенного из образца соли озера Эльтон, – разветвленным пентасахаридом с тетра-L-рамнановой основной цепью $\rightarrow 3,4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$ и остатком $\alpha\text{-D-Glcp}$, замещающим один из остатков $\alpha\text{-L-Rhap}$ в третье положение. Кроме того, для типового штамма морской бактерии *H. halocynthiae* KMM 1376(T) было установлено наличие линейного сульфатированного альфа-D-маннанового О полисахарида с трисахаридным повторяющимся звеном.

Таким образом, полученные нами приоритетные данные о структуре повторяющихся звеньев О-специфических полисахаридов четырех штаммов *Halomonas* spp., изолированных из образцов соли озера Сасык-Сиваш (Крым, Россия), существенно расширяют имеющиеся сведения о структурах полисахаридов поверхности бактерий данного рода.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ БЕЛКА GR56 В АДСОРБЦИИ STX-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА Ф24В

А.С. Кузнецов¹⁹⁴, Е.Е. Куликов¹⁹⁵,
А.К. Голомидова¹⁹⁶, А.В. Летаров¹⁹⁷

Известно, что умеренные бактериофаги способны к лизогенной конверсии, или изменению фенотипа клетки-хозяина вследствие лизогенного цикла фаговой инфекции, в ходе которого не происходит лизиса клеток, и вирус размножается в виде профага. Такой тип взаимодействия между вирусами и бактериями нередко связан с приобретением лизогенными клетками бактерий факторов патогенности. Различные варианты лизогенной конверсии реализуются у лямбда-подобных вирусов, некоторые из которых способны усиливать патогенность клеток бактерий-хозяев. Stx-конвертирующие бактериофаги, заражающие клетки *Escherichia coli*, относятся к лямбдоидным фагам и имеют в составе генома ген шигаподобного токсина *stx*, наличие которого у лизогенных по этим фагам бактерий превращает их в потенциальных продуцентов шигаподобного токсина. Шигатоксигенные *Escherichia coli* (STEC), лизогенные по Stx-фагам, могут вызывать опасные кишечные и почечные токсикоинфекции у сельскохозяйственных животных и человека [1]. Механизмы адсорбции Stx-фагов на поверхности клеток-мишеней, предшествующий формированию STEC-патогенов, остаются не выясненными.

В нашей работе было проведено комплексное исследование адсорбции Stx-конвертирующего бактериофага Ф24В. Данный фаг имеет морфологию подовирусного типа и, помимо собственно Stx-конверсии, способен повышать патогенность бактерии-хозяина путем перестройки ее метаболизма [2]. Нами было показано, что бактериофаг Ф24В инфицирует широкий спектр штаммов *E. coli*, узнавая в качестве конечного рецептора консервативный белок внешней мембраны BamA. Наличие полноценного О-антигена на поверхности клетки подавляет адсорбцию этого бактериофага. Это,

вероятно, связано с пространственным экранированием конечного рецептора полисахаридными цепями [3]. Однако природные варианты лизогенов по Ф24В обладают О-антигеном, что может говорить о взаимодействии фаговой частицы с пока не установленным первичным рецептором, способствующим преодолению фаговой частицей О-полисахаридного слоя, что и определяет спектр хозяев данного фага в природных системах.

Ранее считалось [4], что структурный белок grb1 в составе вириона Ф24В отвечает за связывание фагом его конечного рецептора BamA, однако ряд полученных нами данных говорит о том, что в распознавании конечного рецептора участвует белок gr56. Результаты исследований адсорбции на BamAΔ-штаммах модельного бактериофага λ_2B8, имеющего идентичную белку grb1 Ф24В аминокислотную последовательность в боковых фибриллах, позволили предположить, что белок grb1 не участвует в связывании BamA в процессе адсорбции фага Ф24В. В связи с этим вероятным является предположение, что grb1 взаимодействует с пока не идентифицированным первичным рецептором. В качестве кандидатов на роль первичного рецептора фага Ф24В можно рассматривать различные поверхностные экзополисахариды (ЭПС), выделяемые клеткой-хозяином. Именно такая стратегия адсорбции реализуется у подовируса N4 [5]. Однако результаты титрования препаратов бактериофага Ф24В на различных мутантах по генам синтеза ЭПС не показали достоверной разницы в значениях биологического титра.

Структура белка gr56 также остается загадочной. В результате экспрессии клонированных генов нам удалось получить различные N-концевые трансляционно слитые и делеционные варианты данного белка, но все они оказались нерастворимыми. Прогноз структуры тримерной фибриллы данного белка при помощи алгоритма AlphaFold2 объясняет нерастворимость полученного белкового продукта, так как в соответствии с предложенной структурой С-концевая часть белка не является рецептор-распознающей, а структура в целом не похожа на структуру типичных фаговых адгезинов.

Таким образом, мы полагаем, что белок gr56 играет ключевую роль в жизненном цикле бактериофага Ф24В, взаимодействуя с конечным рецептором и участвуя в необратимой адсорбции вириона на поверхности клетки-мишени. Предсказанная структура рецептор-распознающего комплекса, образованного gr56, позволит разработать методы для получения растворимых вариантов данного белка и экспериментально подтвердить его взаимодействие с конечным рецептором исследуемого бактериофага.

Список литературы:

- [1]. Sausset R., Petit M. A., Gaboriau-Routhiau V., De Paepe M. New insights into intestinal phages // *Mucosal Immunology*. – 2020. – P. 1-11.
- [2]. Holt G. S., Lodge J. K., McCarthy A. J., Graham A. K., Young G., Bridge S. H., Brown A. K., Veses-Garcia M., Lanyon C. V., Sails A., Allison H. E., Smith, D. L. Shigatoxin encoding Bacteriophage Ф24В modulates bacterial metabolism to raise antimicrobial tolerance. – *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – 40424.

¹⁹⁴ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

¹⁹⁵ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия
Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия

¹⁹⁶ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

¹⁹⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

[3]. Golomidova A. K. Efimov A.D., Kulikov E.E., Kuznetsov A. S., Belalov I.S., Letarov A.V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B //Scientific reports. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 1-9.

[4]. Smith D. L., James C. E., Sergeant M. J., Yaxian Y., Saunders J. R., McCarthy A. J., Allison H. E. Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria //Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189. – №. 20. – P. 7223-7233.

[5]. Junkermeier E. H., Hengge R. A Novel Locally c-di-GMP-Controlled Exopolysaccharide Synthase Required for Bacteriophage N4 Infection of *Escherichia coli* //Mbio. – 2021. – V. 12. – №. 6. – E03249-21.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КУЛЬТУР MICROBACTERIUM LACUS И BREVUNDIMONAS BULLATA В УСЛОВИЯХ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А.А. Кузьмицкая¹⁹⁸, Д.Ю. Побережный¹⁹⁹, С.В. Калёнов²⁰⁰

В ходе скрининга сообществ микроорганизмов пойменных биотопов, загрязнённых синтетическими полимерными отходами различного происхождения, был выделен бактериальный консорциум, представленный грамположительными и грамотрицательными палочковидными клетками. Сравнительный анализ генов 16S рНК показал, что данный консорциум включает в себя два штамма, относящихся к видам *Microbacterium lacus* и *Brevundimonas bullata*. Штамм *M. lacus* – грамположительные, неподвижные, аэробные палочковидные клетки неправильной формы, образующие колонии жёлтого цвета. Штамм *B. bullata* – грамотрицательные, подвижные, аэробные палочковидные клетки, образующие слизистые полупрозрачные колонии белого цвета. Предположительно эти две культуры связаны между собой определёнными метаболическими взаимодействиями, так как их крайне затруднительно изолировать друг от друга.

Совместное культивирование *M. lacus* и *B. bullata* в жидкой питательной среде, богатой легкоусвояемыми источниками углерода (например, в питательной среде LB, pH 7, 28°C), вызывает сдвиг популяционного равновесия в сторону увеличения численности клеток *B. bullata*, что обусловлено более высокой скоростью роста этих бактерий, по сравнению с *M. lacus*. Таким образом, в данных условиях культура *M. lacus* подавляется.

Однако совместное культивирование *M. lacus* и *B. bullata* в жидкой питательной среде, содержащей крахмал и дрожжевой экстракт в качестве источников углерода (pH 7, 28°C), позволяет индуцировать рост *M. lacus* и сместить равновесие в сторону преобладания данных бактерий в культуральной жидкости. Это связано с тем, что клетки *B. bullata* не способны утилизировать крахмал в качестве питательного субстрата [1].

Стимулировать дальнейшее увеличение численности *M. lacus* в сообществе можно путём использования техники последовательных пересевов. Консорциум в виде жид-

¹⁹⁸ Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

¹⁹⁹ Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

²⁰⁰ Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

кого инокулята пересеивается, когда штамм *M. laci* находится в стадии экспоненциального прироста биомассы, при этом содержание дрожжевого экстракта в питательной среде постепенно уменьшается. Пересев бинарного сообщества из питательной среды с пониженным содержанием дрожжевого экстракта в среду с прежними его концентрациями вызывает резкое смещение баланса популяции в сторону доминирования *B. bullata*.

Список литературы:

1. Urakami, T., Oyanagi, H., Araki, H., Suzuki, K. I., Komagata, K. (1990). Recharacterization and emended description of the genus *Mycoplana* and description of two new species, *Mycoplana ramosa* and *Mycoplana segnis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 40(4): 434-442.

РЕКОНСТРУКЦИЯ В НАНОДИСКИ ТРИМЕРОВ ДИМЕРОВ КОМПЛЕКСА СЕНСОРНОГО РОДОПСИНА II С ЕГО РОДСТВЕННЫМ ТРАНСДЮСЕРОМ

Д.Д. Куikliна²⁰¹, Ю.Л. Рижиков²⁰²,
В.И. Горделий²⁰³, А.И. Куikliн²⁰⁴

Объектом исследования является фоторецепторный белковый комплекс сенсорного родопсина II (SRII) с его родственным трансдюсером (HtrII) из архей *Natronomonas pharaonis*. Фоторецепторы (наряду с хеморецепторами, сенсорными гистидин-киназами и др.) являются трансмембранными рецепторами двухкомпонентных сигнальных систем (ДКС) – самой распространённой сигнальной системы в природе, которая, однако, отсутствует в клетках млекопитающих. В связи с этим комплекс *NpSRII/NpHtrII* представляет особый интерес для изучения механизмов передачи сигнала ДКС через бактериальную мембрану.

В организме галоархей *N. pharaonis* фоторецептор *NpSRII/NpHtrII* отвечает за отрицательный фототаксис, и, так же, как и хеморецепторы, образует тримеры димеров в мембране [1]. Известно, что *N. pharaonis* оптимально растёт при высокой концентрации NaCl – 3.5 М; соответственно, концентрация соли существенно влияет на структуру и олигомерное состояние комплекса *NpSRII/NpHtrII* [2]. С помощью данных малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) было показано, что при высокой ионной силе раствора (4.0 М NaCl) образуются тримеры димеров, в то время как при низкой наблюдаются только димеры [3,4].

Для дальнейшего исследования представляет интерес получение нанодисков с комплексом *NpSRII/NpHtrII* в нативном олигомерном состоянии (тример димеров). В результате аналитической эксклюзионной хроматографии оказалось, что прединкубированный в буфере с высокой концентрацией соли белок остаётся в своём олигомерном состоянии при переводе его в буфер с низким содержанием соли (150 mM NaCl). В данной работе проверялась гипотеза, что это позволит реконструировать в нанодиски непосредственно тример димеров исследуемого белкового комплекса, так как существующие протоколы реконструкции белка в нанодиски

²⁰¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия. E-mail: kuklina.dd@phystech.edu

²⁰² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия

²⁰³ Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Гренобль, Франция

²⁰⁴ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Гренобль, Франция

требуют низкой концентрации соли, а отработка нового протокола для требуемых условий может быть затратной.

Для сравнения в липидные нанодиски MSP2N2 с DMPC были реконструированы димеры комплекса *NpSRII/NpHtrII*, а также тримеры димеров, находящиеся в буфере с низким содержанием NaCl. На графике (рис. 1) приведены результаты эксклюзионной хроматографии этих образцов. С целью оценить эффективность реконструкции используется отношение интенсивностей пиков поглощения встроенных в нанодиски тримеров димеров и агрегировавшего белка. Для димеров это отношение близко к 1, в то время как для тримеров димеров оно равняется 3. Таким образом, эффективность получения нанодисков с тримерами димеров комплекса *NpSRII/NpHtrII* при использовании димеров в три раза выше, чем при использовании сформированных тримеров димеров. Однако есть основания полагать, что при реконструкции в нанодиски непосредственно тримеров димеров они остаются в своём нативном состоянии, а димеры, хоть и помещаются в нанодиск по три штуки, не обязательно образуют междимерные контакты, необходимые для функциональной активности фоторецептора *NpSRII/NpHtrII*.

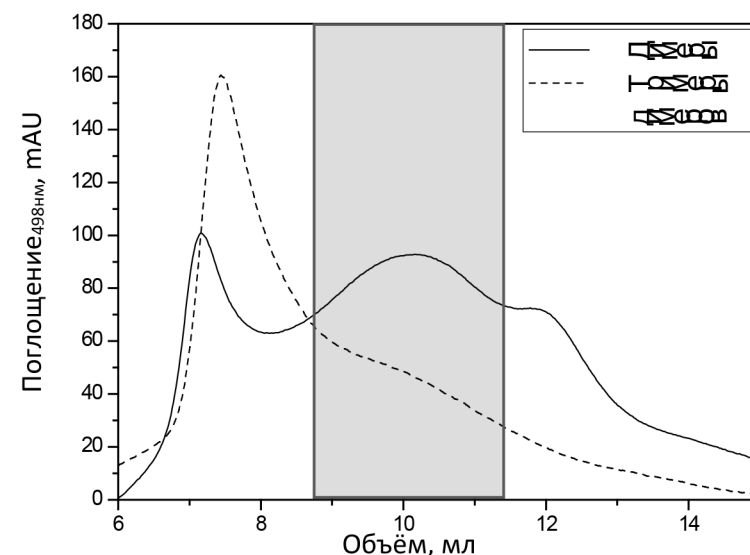


Рис. 1. Результаты эксклюзионной хроматографии. Зависимость показателя поглощения на длине волны 498 нм от объема элюируемого белка. Сплошной линией обозначены нанодиски, в которые реконструировались димеры; прерывистой – нанодиски, в которые реконструировались тримеры димеров комплекса; выделена область (в мл), в которой наблюдаются нанодиски с тримерами димеров комплекса *NpSRII/NpHtrII*

Образование правильных междимерных контактов ещё предстоит проверить с помощью малоуглового рассеяния и электронной микроскопии с использованием негативного контрастирования, и, в случае успеха, возможность реконструировать в нанодиски комплекса *NpSRII/NpHtrII* в его нативном олигомерном состоянии откроет значительные перспективы для дальнейших структурных исследований данного бел-

кового комплекса, таких как криоэлектронная микроскопия одиночных частиц и рентгеноструктурный анализ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Грант РФФИ № 20-54-12027.

Список литературы:

- [1] Orekhov, P. *et al.* Sensory Rhodopsin I and sensory Rhodopsin II form trimers of dimers in complex with their cognate transducers. *Photochem. Photobiol.* 93, 796–804 (2017)
- [2] Budyak, I. L. *et al.* Shape and oligomerization state of the cytoplasmic domain of the phototaxis transducer II from *Natronobacterium pharaonis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15428–15433 (2006)
- [3] Ryzhykau, Y.L., Orekhov, P.S., Rulev, M.I. *et al.* Molecular model of a sensor of two-component signaling system. *Sci Rep* 11, 10774 (2021)
- [4] Ryzhykau, Y.L., *et al.* Ambiguities in and completeness of SAS data analysis of membrane proteins: the case of the sensory rhodopsin II–transducer complex. *Acta Cryst D* 77, 1386–1400 (2021)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ОДНОРЕАКТОРНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРОДА И МЕТАНА АНАЭРОБНЫМ МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ ЗА СЧЕТ СТИМУЛЯЦИИ ГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИОНАМИ ЖЕЛЕЗА (II) И ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ АКТИВИРОВАННЫМ УГЛЕМ

А.А. Лайкова²⁰⁵, А.А. Ковалев²⁰⁶, Д.А. Ковалев²⁰⁷,
Е.А. Журавлева²⁰⁸, Ю.В. Литти²⁰⁹

Анаэробное сбраживание – это безопасный и экологичный метод переработки органических отходов, который позволяет снизить экологическую нагрузку на окружающую среду и получить «зеленую» энергию в виде водорода (H_2) и метана (CH_4). Известно, что при анаэробном разложении биополимеров большую роль играет гидролитическое и ацидогенное сообщество микроорганизмов, которое разлагает биополимеры с образованием более простых соединений, в частности, летучих жирных кислот (ЛЖК) и H_2 . Микроорганизмы, продуцирующие H_2 , имеют специфические ферменты – гидрогеназы, содержащие в активном центре атомы никеля или железа. Эффективность работы гидрогеназ может быть улучшена добавлением растворимых железо- или никельсодержащих соединений, а также наночастиц нулевалентных металлов [2].

Одним из способов повышения глубины анаэробной конверсии органических отходов является технология двухстадийного анаэробного сбраживания с последовательным получением H_2 на первой и CH_4 на второй стадии. Модернизация этой технологии направлена на увеличение выхода конечных продуктов. Для решения этой задачи в современных научных публикациях используют внесение добавок, повышающих водородную продукцию за счет стимуляции гидрогеназ, а также метаногенную – за счет стимуляции прямого межвидового переноса электронов (DIET) между

синтрофными бактериями и метаногенными археями, не зависящего от парциального давления H_2 [1].

Несмотря на очевидные преимущества, двухстадийное анаэробное сбраживание требует разделение стадий в пространстве, т.е. использование 2-х реакторов вместо одного, что удорожает процесс. Разработка эффективной однореакторной технологии двухстадийного анаэробного сбраживания позволила бы получать последовательно H_2 и CH_4 за счет разделения стадий во времени и устранить затраты на постройку второго реактора. Для проверки возможности практической реализации этой идеи в данной работе использовали сочетание (1) биоаугментации активным водород-продуцентом *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2, устойчивым к низким pH, (2) поддержания низкого начального pH (5.5) для снижения активности гидрогенотрофных метаногенов, (3) внесения добавок в виде растворимого железа (II) и частиц гранулированного активированного угля (ГАУ) для стимуляции, соответственно, гидрогеназ и DIET.

В ходе эксперимента предполагалось быстрое получение H_2 на первой стадии при низком pH, затем плавное повышение pH за счет потребления ЛЖК синтрофным сообществом с активизацией DIET и продукцией метана. Модель была опробована на двух инокулятах с различным содержанием железа. В качестве инокулята 1 использовался термофильно сброженный осадок сточных вод, полученный с Люберецких и Череповецких очистных сооружений. Инокулят 2 представлял собой термофильно сброженную модель пищевых отходов, предварительно обработанную (до сбраживания) в аппарате вихревого слоя (АВС). Концентрация железа, определенная по методу ИСП-спектрометрии, в инокуляте 1 была выше, чем в инокуляте 2. В качестве субстрата была использована глюкоза (2,5 г/л). Микробное сообщество было обогащено водородпродуцирующей бактерией *T. thermosaccharolyticum* SP-H₂, устойчивой к низким pH. Эксперимент проводился в периодическом режиме, при температуре 55°C в анаэробных условиях. В ходе работы проводилось исследование динамики pH, состава газовой фазы и ЛЖК. Для оценки влияния вносимых добавок на активность водородпродуцирующих микроорганизмов, измерялась гидрогеназная активность по методу восстановления метилвиологена дитионитом натрия. Наиболее высокая активность фермента наблюдалась в опытных образцах, куда были добавлены и ГАУ, и сульфат железа (II). Во флаконах с одновременным добавлением ГАУ и сульфата железа (II) были последовательно получены газообразные продукты: и водород, и метан, что подтверждает возможность реализации предложенной схемы, однако кинетические параметры продукции H_2 и CH_4 различались в зависимости от инокулята. Дальнейшие исследования должны быть направлены на определение оптимальных начальных pH, концентраций стимулирующих добавок, биоаугментирующей и метаногенной культуры, а также подтверждения стабильности предложенной однореакторной двухстадийной системы анаэробного сбраживания в полупроточном режиме.

²⁰⁵ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания
Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²⁰⁶ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ»

²⁰⁷ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ»

²⁰⁸ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания

²⁰⁹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-49-02002, <https://rscf.ru/project/22-49-02002/>

Список литературы:

1. Cheng J., Li, H., Ding L., Zhou J., Song W., Li Y. Y., Lin R. Improving hydrogen and methane co-generation in cascading dark fermentation and anaerobic digestion: the effect of magnetite nanoparticles on microbial electron transfer and syntrophism //Chemical Engineering Journal. – 2020. – Т. 397. – С. 125394.
2. Taherdanak M., Zilouei H., Karimi K. The effects of Fe0 and Ni0 nanoparticles versus Fe2+ and Ni2+ ions on dark hydrogen fermentation //International Journal of Hydrogen Energy. – 2016. – Т. 41. – №. 1. – С. 167–173.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОЗИЛИРОВАННОЙ И НЕГЛИКОЗИЛИРОВАННОЙ ФОРМ В-МАННАНАЗЫ, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В ДРОЖЖАХ *OGATAEA HAGLERORUM*

А.Р. Лаптева²¹⁰, Д.А. Подплетнев²¹¹, М.Г. Тарутина²¹²

Эндо-1,4- β -маннаназа или 1,4- β -D-маннан-маннаногидролаза (ЕС 3.2.1.78, обычно называемая β -маннаназой) является основным ферментом, который инициирует и катализирует случайное расщепление внутренних β -1,4-маннозидных связей в основной цепи маннанов [1]. Маннаны представляют собой группу полисахаридов, которые наряду с целлюлозой входят в структуру клеточной стенки наземных и морских растений [2]. β -маннаназы были идентифицированы и выделены из многих организмов, включая бактерии, грибы, растения и моллюски.

β -маннаназа используется в различных областях промышленности, таких как пищевая и текстильная промышленность, кормопроизводство, а также при бурении нефтяных скважин, экстракции кофе и отбеливании целлюлозы [3].

В сельском хозяйстве β -маннаназа используется в качестве кормовой добавки. Такие β -маннаназы должны обладать следующими свойствами: (1) температурная стабильность, так как при гранулировании кормов происходит кратковременный нагрев до 95 °С; (2) устойчивость к пищеварительным ферментам животного; (3) стабильность в широком диапазоне pH, приблизительно 2,5–6,8. [4].

Таким образом, получение β -маннаназ с высокой активностью и заданными характеристиками является актуальной проблемой на сегодняшний день, решением которой может быть создание рекомбинантных β -маннаназ путем использования генно-инженерных технологий.

Целью данной работы является сравнительная характеристика гликозилированной и дегликозилированной форм β -маннаназы, синтезированной клетками термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea haglerorum*. Известно, что экспрессионные системы дрожжей характеризуются присутствием эукариотических посттрансляцион-

²¹⁰ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²¹¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²¹² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

ных модификаций, таких как обработка сигнальной последовательности, сворачивание, образование дисульфидных мостиков и гликозилирование. Показано, что наличие *N*-гликозилирования у рекомбинатного белка может оказывать влияние на некоторые свойства фермента, такие как термостабильность и повышение устойчивости к протеазам, возможно за счет того, что углеводная цепь, состоящая из маннозных остатков может покрывать участки белка.

В данной работе синтетический ген *MANS*, кодирующий β -маннаназу (*ManS*) был клонирован и экспрессирован в штамме *O. haglerorum* ВКПМ Y-2584. Фермент *ManS* секретируется в виде гликопротеина. Чтобы сравнить гликозилированную и *N*-дегликозилированную формы β -маннаназы, нами был получен ген *MANSmod*, кодирующий белок с заменой 32NRTE на 32NRGE в сайте *N*-гликозилирования. Ген *MANSmod* также был клонирован и экспрессирован в дрожжах *O. haglerorum*. Рекомбинантные β -маннаназы были очищены и охарактеризованы. Молекулярная масса гликозилированного и *N*-дегликозилированного белков составляла 40 кДа и 38 кДа соответственно, согласно оценке SDS-PAGE. Для этих белков были определены их общие и кинетические свойства. *ManS* и *ManSmod* имели полностью идентичные следующие биохимические свойства: оптимальные значения pH и температуры, термостабильность, влияние ионов металлов, а также стабильность в диапазоне pH. Удельная активность очищенных *ManS* и *ManSmod* составляла 25 300 Ед/мг и 10 040 Ед/мг, соответственно, при использовании камеди рожкового дерева в качестве субстрата.

Таким образом, установлено, что замена 32NRTE на 32NRGE в сайте *N*-гликозилирования β -маннаназы не оказывает влияния на термостабильность фермента, но снижает в 2 раза удельную активность фермента по сравнению с гликозилированной *ManS*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075-15-2019-1659)

Список литературы:

1. Singh, S., Singh, G., & Arya, S. K. Mannans: An overview of properties and application in food products // International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119, 79–95.
2. Moreira L, Filho E: An overview of mannan structure and mannandegrading enzyme systems. Appl Microbiol Biotechnol 2008, 79(2):165–178.
3. Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. Crit Rev Biotechnol. 2007 Oct-Dec;27(4):197-216.
4. Hu W, Liu X, Li Y, Liu D, Kuang Z, Qian C, Yao D. Rational design for the stability improvement of *Armillariella tabescens* β -mannanase MAN47 based on N-glycosylation modification. Enzyme Microb Technol. 2017 Feb; 97:82-89.

МЕТОД ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНОЙ ИНФОРМАЦИИ

Т.Н. Лахова²¹³, Ф.В. Казанцев²¹⁴, А.М. Мухин²¹⁵,
Д.Ю. Ощепков²¹⁶, С.А. Лашин²¹⁷

За последние годы накоплен огромный объём данных полногеномного секвенирования. Большой пласт этой информации относится к бактериям. Анализ этих данных отстаёт от темпов их накопления, в частности в контексте исследований регуляции транскрипции. В тоже время в биотехнологических задачах часто встают следующие вопросы: как привести метаболизм бактерии к оптимальному режиму функционирования с увеличенным выходом целевых продуктов? Какое влияние на это оказывает регуляция экспрессии генов? В свою очередь, математическое моделирование позволяет исследовать пути биосинтеза белков, метаболитов, регуляцию процессов, осуществляемую белками, чтобы узнать, при каких условиях возможен максимальный выход целевого продукта. Для решения части этих задач в работе представлен метод автоматизации построения математических моделей регуляции транскрипции по геномным данным бактерий.

Условно работу метода можно разделить на два этапа. На первом этапе берётся геном бактерии с первичной аннотацией (предсказаны гены и белки), на основе которого ищется репертуар транскрипционных факторов (ТФ) и их места посадки непосредственно на ДНК бактерии. Для вышеперечисленного с помощью вычислительного конвейера определяется оперонная структура, выделяются промоторные области для оперонов, предсказываются мотивы de-novo, и среди мотивов отбираются кандидаты в сайты связывания транскрипционных факторов (ССТФ) (то есть осуществляется сравнение перепредставленных мотивов с базой данных известных сайтов связывания для бактериальных ТФ, таким образом, выявляются ТФ, потенциально способные осуществлять регуляцию тех оперонов, в чьих промоторах выявлены мотивы, сходные

²¹³ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²¹⁴ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

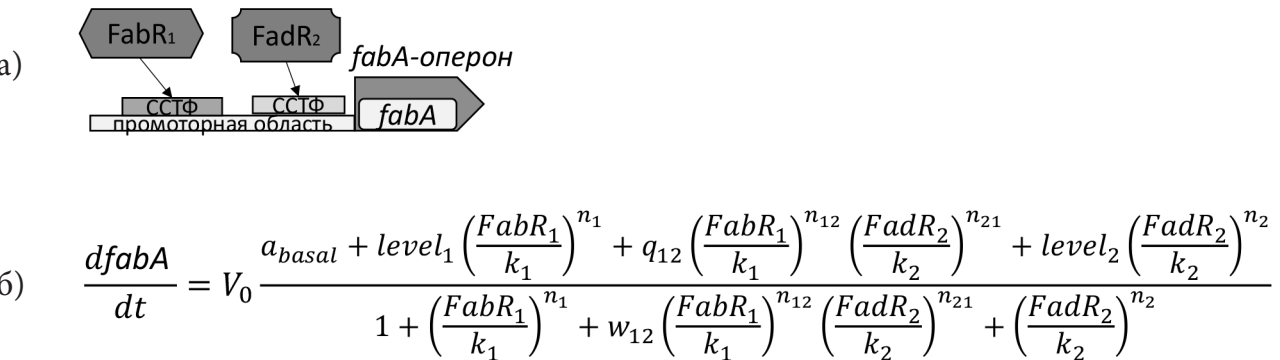
²¹⁵ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²¹⁶ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²¹⁷ Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

с их сайтами связывания). Дополнительно поиск ТФ осуществляется на основе базы CollecTF, где хранится информация об известных ТФ. Результатом этого этапа является серия структурных моделей оперонов, которые включают в себя ССТФ в промоторных областях и список генов, входящих в оперон (см. рисунок а). Затем осуществляется построение сети взаимодействия между оперонами и соответствующими ТФ в масштабе генома, где элементами сети являются ТФ, гены, опероны и связи между ними.

Такие сети можно визуализировать в программе Cytoscape. Итоговая сеть регуляторных взаимодействий используется на следующем этапе – построении моделей регуляции транскрипции (рисунок б).



Разработанный алгоритм по построению моделей заключается в том, чтобы перебрать всевозможные варианты взаимодействий ТФ со своими сайтами связывания для конкретного оперона. Финальная формула генерируется в терминах обобщённых функций Хилла, которая описывает в общем виде процессы синтеза как без регуляции со стороны ТФ, так и с учётом регуляции оперона. Алгоритм реализован как программа на кроссплатформенном языке Java. Таким образом, по поданному на вход описанию организации регуляторной сети, на выходе программы получается серия текстовых файлов с уравнениями и описанием параметров моделей. Каждый файл содержит только одну модель, описывающую регуляцию транскрипции одного конкретного оперона.

Предложенный метод применяется к аннотированным геномам бактерий из базы данных Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН. Он также может быть использован для любых бактериальных геномов, которые имеют первичную аннотацию. При этом данные алгоритмы можно применять не только к геномам, собранным до уровня полной хромосомы, но и к геномам, собранным до скаффолдов.

Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра Федерального исследовательского центра ИЦиГ СО РАН, соглашение с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2019-1662.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УГЛЕВОДОРОДНОГО СУБСТРАТА НА РОСТ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* X5 И НА ПРОДУКЦИЮ БИОСУРФАКТАНТА

Т.И. Леонова²¹⁸

Биосурфактанты (биоПАВ) – это поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые продуцируются преимущественно микроорганизмами, в ответ на присутствие в питательной среде гидрофобного субстрата. Основной функцией биосурфактантов является снижение поверхностного (ПН) и межфазного натяжений. БиоПАВ имеют множество преимуществ в отличие от синтетических ПАВ: биоразлагаемость, синтез из дешевого сырья, стабильность свойств в широком диапазоне рН и температур, отсутствие токсичности и др. (Рудакова М.А., 2021). За счёт своего разнообразия и высокой эффективности биоПАВ всё чаще находят применение в различных отраслях, таких как нефтеперерабатывающая, химическая, фармацевтическая и т.д.

С точки зрения производственного процесса, биосурфактанты все же менее конкурентоспособны по сравнению с их синтетическими аналогами, поэтому снижение стоимости производства и разработка новых технологий получения биоПАВ являются одним из приоритетных направлений при изучении данных веществ (Sun W. et al., 2021). Одним из таких направлений является подбор наиболее дешёвого субстрата. В изучении процессов синтеза биоПАВ часто в качестве источника углерода используют алканы. Так как чистые вещества являются дорогостоящими, альтернативой могут служить легкодоступные возобновляемые источники, например, растительные масла.

Целью работы было изучить влияние различной концентрации подсолнечного масла на рост бактерий-нефтедеструкторов *Rhodococcus erythropolis* X5 и продукцию гликолипидных биосурфактантов в культуральной среде.

Штамм X5 культивировали при 28 оС при рН 7,0 на минеральной среде Эванса, содержащей в качестве субстрата подсолнечное масло в количестве 1, 2, 5 и 9 % от объёма питательной среды (Льонг Т.М. и др., 2016).

Известно, что вторичные метаболиты, включая биосурфактанты, продуцируются в период стационарной фазы роста микроорганизма. Поэтому для определения параметров роста и выхода на стационарную фазу были получены кривые роста культу-

²¹⁸ Тульский Государственный университет, Тула, Россия

ры (рис.1). Рост микроорганизмов определяли по оптической плотности клеточной суспензии (при 590 нм). При концентрации масла 2 % выход на стационар происходит раньше, чем при всех остальных выбранных концентрациях (на 2-е сутки). При 5 и 7 % стационарная фаза роста культуры была отмечена на 3 сутки, при 2 и 9 % на 4-е сутки.

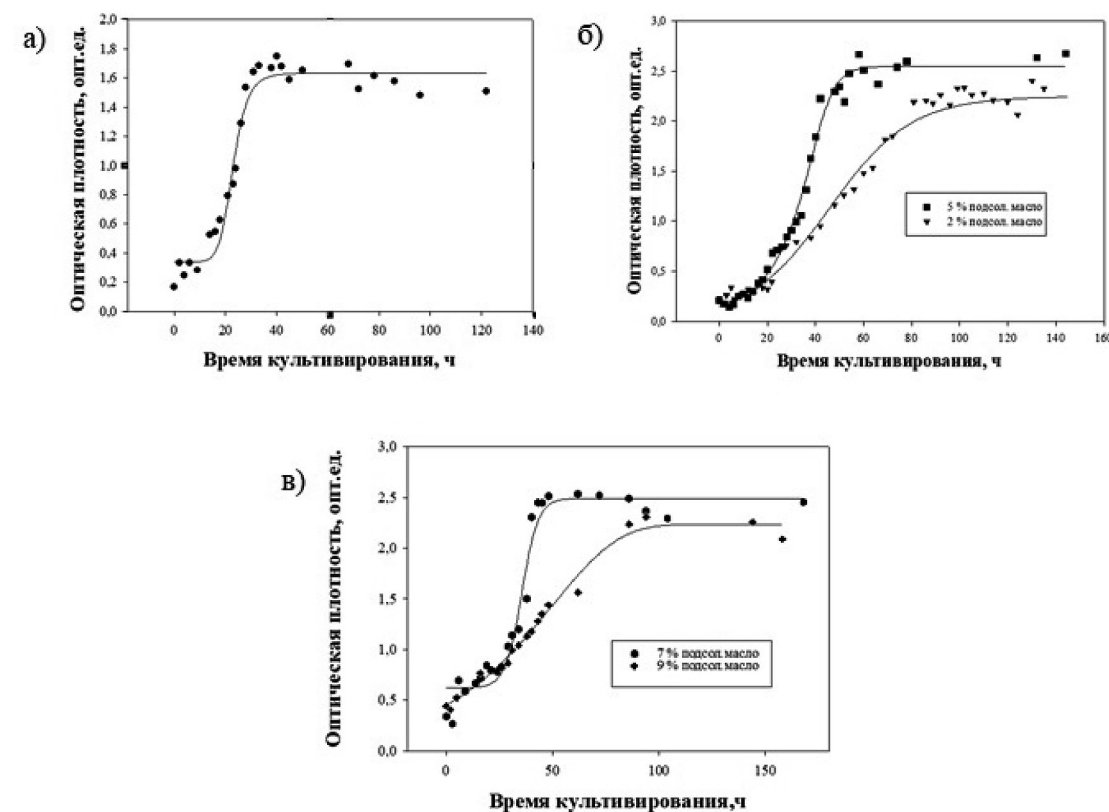


Рис. 1. Кривые роста бактерий *Rh. erythropolis* X5 при различной концентрации подсолнечного масла: а) 1 % субстрата; б) 2 и 5 % субстрата; в) 7 и 9 % субстрата

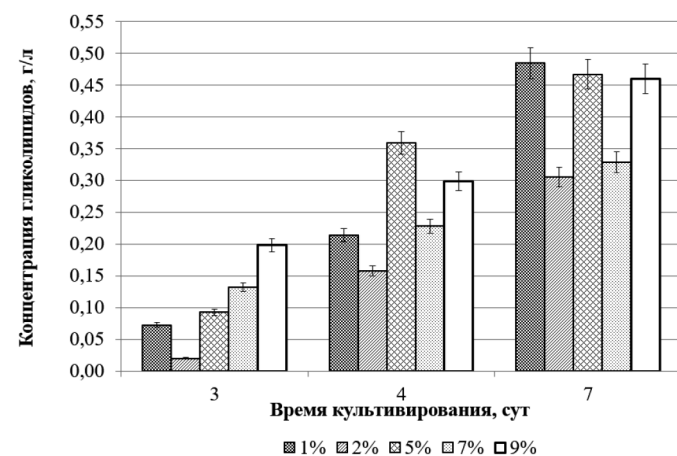


Рис. 2. Динамика продукции гликолипидных биосурфактантов при различной концентрации подсолнечного масла

Содержание гликолипидных биоПАВ в бесклеточных супернатантах определяли на 3, 4 и 7 сутки роста штамма X5 спектрофотометрически фенольно-серным методом (Льонг Т.М. и др., 2016). Предварительно клетки удаляли центрифугированием в течение 10 минут при 10000 об/мин. Полученные данные (рисунок 2) указывают на то, что с развитием стационарной фазы количество гликолипидных биосурфактантов увеличивается. Максимальный выход продукции при всех концентрациях масла отмечался на 7 сутки роста культуры. При концентрациях 2 и 7 % подсолнечного масла концентрация биоПАВ в среде составила 0,31 и 0,33 г/л соответственно. Максимальное значение до 0,5 г/л было отмечено при концентрации 1, 5 и 9 % субстрата. Полученная концентрация гликолипидов при 2 и 7 % масла коррелирует с литературными данными при культивировании того же штамма на н-гексадекане (Льонг Т.М. и др., 2016). При других концентрациях субстрата выход гликолипидов выше, чем в работе (White D.A., 2013) при культивировании штамма *Rhodococcus* sp. PML026 на подсолнечном масле, где содержание биоПАВ составило 0,3 г/л.

В данном исследовании было установлено, что с длительностью культивирования штамма в стационарной фазе происходит увеличение выхода биосурфактанта, а концентрация растительного масла не значительно влияет на продукцию. Поэтому использование более низких концентраций (1, 2%) растительного масла при культивировании данного штамма является наиболее выгодным с экономической стороны при получении микробных ПАВ. Кроме того, содержание биосурфактанта в среде при культивировании на растительном масле не ниже, чем при культивировании на часто используемых алканах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Список литературы:

1. Рудакова М. А., Галицкая П. Ю., Селивановская С. Ю. Биосурфактанты: современные тренды применения //ученые записки казанского университета. Серия естественные науки. 2021. Т.163. №. 2. С. 177-208.
2. Sun W. et al. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas* sp. CQ2 and its application for remediation of heavy metal contaminated soil //Chemosphere. 2021. V. 265. P. 1-46.
3. Льонг Т. М. и др. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus*-потенциальные продуценты биосурфактантов //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – №. 1 (16). – С. 50-60.
4. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp.,strain PML026 // J Appl Microbiol. – 2013. V. 115. № 3. P. 744-55.

РОЛЬ PAS-ДОМЕНА СЕНСОРНОЙ ГИСТИДИНКИНАЗЫ НІК33 В РЕГУЛЯЦИИ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ У SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 GT-L

А.В. Леусенко²¹⁹, К.С. Миронов²²⁰, Д.А. Лось²²¹

PAS (Per-ARNT-Sim) домен – это широко распространенная функциональная часть структуры белков, встречающихся у представителей всех трех царств жизни – архей, прокариот и эукариот. Биологические функции белков, в которых идентифицирован PAS домен, весьма разнообразны. К этой группе принадлежат гистидин- и серин/треонининовые протеинкиназы, хемо- и фоторецепторы, фосфодиэстеразы, ионные каналы, белки, управляющие циркадными ритмами, а также различные регуляторы клеточных ответов (Taylor, Zhulin, 1999). Непосредственно сам PAS-домен отвечает за сенсорную и сигнальную функции этих белков; и, одновременно, принимает участие в формировании их третичной структуры (Stuffle et al., 2021). Hik33 –сенсорная гистидинкиназа, которая вместе с соответствующим регулятором ответа (Rre), составляет двухкомпонентную сигнальную систему. Hik33 принимает участие в регуляции экспрессии большого количества генов в ответ на холодовой, солевой и гиперосмотический стрессы (Los et al., 2010). Структура Hik33 включает, предположительно, три трансмембранных (TM1, TM2 и TM3), а также HAMP-, PAS- и киназный домены (согласно базе данных Uniprot). Ранее в экспериментах было показано, что при воздействии холодового стресса на клетки *Synechocystis* на свету индуцируется транскрипция Hik33-зависимых генов *hliB*, *ndhD2* и *desB*, в то время как в темноте индукции не происходит. Это указывает на явный светозависимый характер передачи сигнала холодового стресса через Hik33 (Mironov et al., 2012). Дальнейшие исследования показали, что Hik33 оказывает наибольшее влияние на уровень экспрессии *hliB*, *ndhD2* и *desB* при воздействии красного света (700 нм) (Mironov et al., 2014). Согласно литературным данным наиболее вероятным кандидатом на роль светового сенсора является PAS домен. В то же время Diego de Mendoza с коллегами в своих работах показал, что гистидинкиназа DesK (температурный сенсор у *Bacillus subtilis*) распознает изменение толщины мембраны при снижении температуры окружающей среды с помощью ТМ доменов (Cybulski et al.,

2010). В настоящей работе для изучения функциональной роли отдельных доменов Hik33 в передаче сигнала были получены независимые мутанты *Synechocystis*, несущие эту гистидинкиназу с частично ($\Delta 2/3$ (TM1-TM3)) и целиком (Δ (TM1-TM3)) удаленными трансмембранными доменами, а также мутант с делецией по PAS-домену (Δ PAS).

С помощью ПЦР-РВ изучено изменение уровня экспрессии генов *hliB*, *lilA*, *ndhD2*, находящихся под контролем Hik33, и Hik33-независимых генов – *rbpA1* и *crhR* (Los et al., 2010) в мутантах с модифицированной гистидинкиназой в условиях холодового стресса при наличии или отсутствии света. Показано, что удаление всех трех трансмембранных доменов или PAS домена приводит к критическому снижению уровня экспрессии у генов *hliB*, *lilA* и *ndhD2* как на свету, так и в темноте. Мутантный штамм с гибридным трансмембранным доменом, состоящим из N-концевой части TM1 и C-концевой части TM3 (или $\Delta 2/3$ (TM1-TM3)), индуцировал экспрессию Hik33-зависимых генов как и штамм дикого типа (Рис.1).

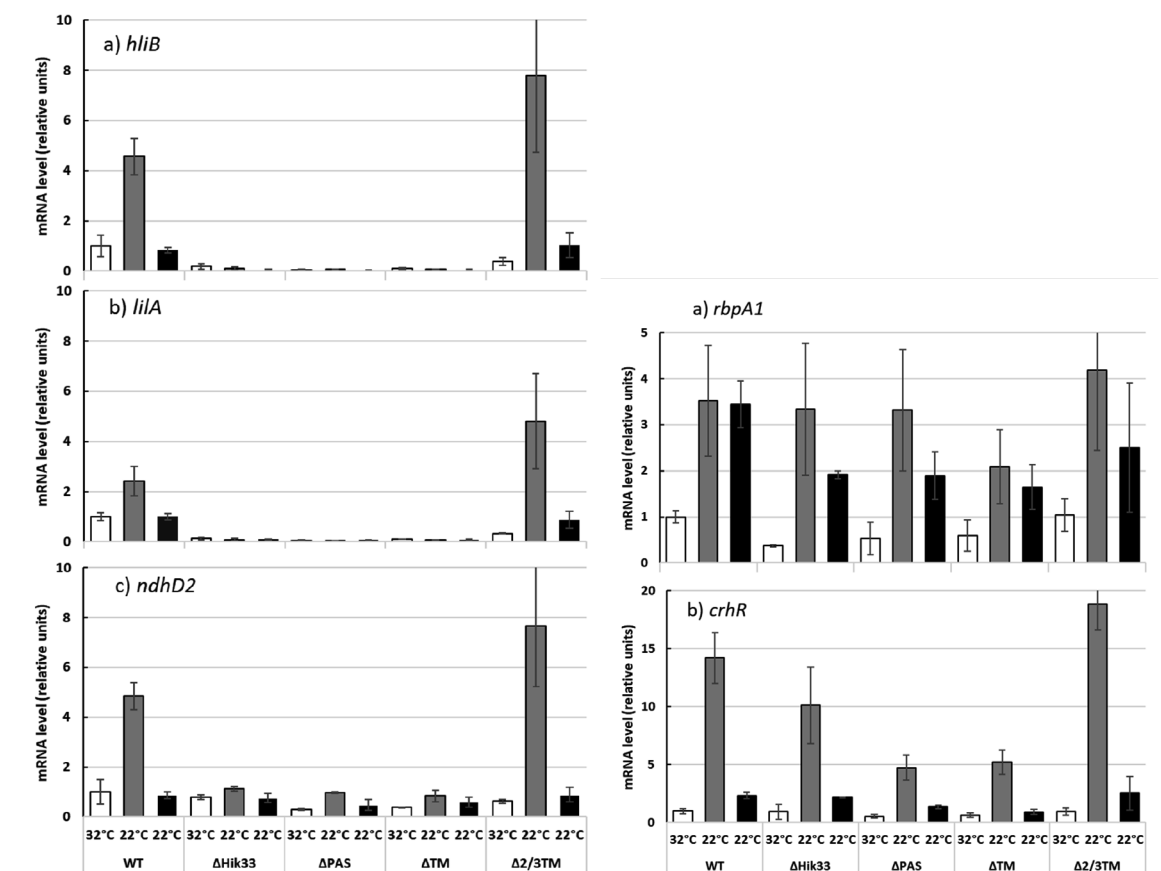


Рис.1. Относительная экспрессия Hik33-зависимых (*hliB*, *lilA*, *ndhD2*) и Hik33-независимых (*rbpA1*, *crhR*) генов. Клетки росли в среде BG11 при 32°C и постоянном свете с аэрацией воздухом, содержащим 1,5% CO₂ (белые столбики), затем переносились на 22°C и инкубировались 30 минут на свету (серые столбики) или в темноте (черные столбики)

В случае Hik33-независимого гена *rbpA1* очевидно, что модификации в гистидинкиназе не приводят к значительным изменениям в уровне экспрессии.

²¹⁹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²²⁰ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²²¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Примечательно, что ген *crhR*, ранее считавшийся независимым от регуляции Hik33, по всей видимости, все же находится под частичным или опосредованным контролем данной гистидинкиназы.

Полученные данные говорят о том, что и трансмембранные домены и PAS домен являются критически важными модулями для функциональной активности Hik33. Результаты, полученные для мутантных штаммов *Synechocystis* с Hik33 с полностью удаленными ТМ доменами или гибридным ТМ доменом, аналогичны результатам группы Diego de Mendoza для DesK в *Bacillus subtilis*, что согласуется с гипотезой универсального механизма распознавания холодового стресса.

Изучение механизмов получения и передачи сигналов гистидинкиназой Hik33 в настоящее время продолжается.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-30003.

Список литературы:

1. Cybulski, L.E.; Martín, M.; Mansilla, M.C.; Fernández, A.; de Mendoza, D. Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Curr. Biol.* 2010, 20, 1539–1544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.074>
2. Los D.A., Zorina A., Sinetova M., Kryazhov X., Mironov K., Zinchenko V.V. Stress Sensors and Signal Transducers in Cyanobacteria // *Sensors*. 2010. V. 10 P. 2386-2415. DOI: 10.3390/s100302386
3. Mironov K.S., Sidorov R.A., Trofimova M.S., Bedbenov V.S., Tsydendambaev V.D., Allakhverdiev S.I., Los D.A. Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis* // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. V. 1817. P. 1352-1359. DOI: 10.1016/j.bbabo.2011.12.011
4. Mironov K.S., Sidorov R.A., Kreslavski V.D., Bedbenov B.S., Tsydendambaev V.D., Los D.A. Cold-induced gene expression and x3 fatty acid unsaturation is controlled by red light in *Synechocystis* // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014. V. 137. P. 84-88. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.03.001
5. Stuffle E.S., Johnson M.S., Watts K.J. PAS domains in bacterial signal transduction // *Current Opinion in Microbiol.* 2021. V. 61. P. 8-15. DOI: 10.1016/j.mib.2021.01.004
6. Taylor B.L., Zhulin I. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light // *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. P. 479-506. DOI: 10.1128/mmbr.63.2.479-506.1999

СУКЦЕССИЯ МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ ОЧИСТКЕ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД

З.Н. Литвиненко²²², Л.М. Кондратьева²²³

Подземные воды являются крупнейшим источником пресной воды на Земле и обеспечивают жизненно необходимой питьевой водой более 50 процентов населения мира [1]. В процессе водоподготовки подземных вод (ПВ) неизбежно возникают различные проблемы, обусловленные абиотическими и биотическими факторами [2]. Среди них важное значение принадлежит микробиологическим показателям. Микроорганизмы определяют миграцию и дифференциацию химических элементов в биосфере, участвуют в круговороте веществ и энергии. Они быстро осваивают новые местообитания, адаптируются к меняющимся факторам окружающей среды [3]. Эти процессы неизбежно сопровождаются сукцессионными перестройками микробных сообществ в природных и природно-антропогенных нишах, что способствует возникновению непредвиденных результатов, связанных с адаптационными возможностями микробных консорциумов (МК) и их способностью образовывать биопленки (БП) на различных этапах водоподготовки. Цель работы заключалась в изучении сукцессионных перестроек МК, присутствующих на различных технологических этапах водоподготовки железосодержащих подземных вод.

Объектами исследования являлись МК биопленок, сформированных на различном оборудовании системы водоподготовки ПВ Тунгусского месторождения, расположенного в центральной части Среднеамурского артезианского бассейна в междуречье Амура и Тунгуски. Применяемый процесс внутриводопроводной очистки воды основан на создании в водоносном горизонте искусственных геохимических барьеров, в пределах которых происходят сложные физико-химические и биологические процессы, приводящие к осаждению железа и марганца в порах водоносного пласта [4]. Такие барьеры создаются путем закачки в пласт кислородсодержащей воды, что приводит к изменению восстановительной обстановки на окислительную. Микробиологический анализ, молекулярно-биологические методы и методы электронного микроскопирования позволили изучить структуру микробного сообщества и их количественного содержания.

Доминирующими филумами в природных подземных водах Тунгусского месторождения являлись Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi и др., ко-

²²² Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, ХФИЦ ДВО РАН, Хабаровск, Россия

²²³ Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, ХФИЦ ДВО РАН, Хабаровск, Россия

торые были также идентифицированы в аналогичных системах ПВ [5]. Доминирование конкретных представителей связано с характеристиками откачиваемой воды: в ней могли присутствовать как автохтонные бактерии, поступающие из пластовых вод и из порового пространства, так и аллохтонные микроорганизмы, проникающие с поверхностной инфильтрацией. Большое влияние на трансформацию структуры микробных сообществ на этапе водоподготовки в пласте оказала аэрация. После насыщения водоносного горизонта аэрируемой водой, произошла сукцессионная перестройка и увеличение разнообразия микроорганизмов.

Специфические условия водоподготовки в наземных сооружениях (декарбонизатор, резервуар чистой воды) характеризовались присутствием “застойных зон” с низкой проточностью и повышением концентрации кислорода (до 11 мг/л). Такие характеристики способствовали увеличению численности МК (Табл.1) и изменению структуры сообщества микроорганизмов за счет появления пигментированных колоний, способных к формированию экзополимерного матрикса.

Таблица 1.

Численность физиологических групп бактерий в пробах воды, отобранной на разных этапах водоподготовки

Место отбора проб	ОЧГБ, КОЕ/мл	АМБ, КОЕ/мл	ЖМБ, КОЕ/мл
Скважина (инфильтрация)	90	20	1
Скважина (откачка)	360	60	0
ДК	5000	2450	160
РЧВ 1	1310	120	35
РЧВ 2	330	90	0

Примечание. ДК – декарбонизатор, РЧВ – резервуар чистой воды, ОЧГБ – общая численность гетеротрофных бактерий, АМБ – аммонифицирующие бактерии, ЖМБ – железо-марганцевые бактерии, КОЕ – колониеобразующие единицы.

Молекулярно-биологические исследования показали, что в составе биопленок, сформировавшихся на наземном оборудовании при водоподготовке, присутствовали представители железо-марганцевых бактерий *Gallionella*, *Rhodoferrax*, *Crenothrix*, *Geothrix*. Эта группа бактерий способна инициировать формирование слизистых биопленок и инкрустацию поверхности клеток гидроксидами железа. Было показано, что данные представители могли принимать участие в процессах коагуляции порового пространства водоносного горизонта за счет аккумуляции ионов железа и марганца на поверхности своих клеток и продуцирования экзополимерного матрикса.

При помощи сканирующей электронной микроскопии в составе исследуемых биопленок, сформированных на заключительных этапах водоподготовки – в РЧВ, были об-

наружены более сложные микроструктуры, включающие бактериальные нитевидные чехлы, покоящиеся клетки в виде цист, «гвоздевидные» и спиралевидные наноструктуры, окруженные слизистым полимерным матриксом, а также раковинные амебы, которые могли участвовать в формировании сложной трофической связи с гетеротрофными бактериями, контролируя при этом таксономический и морфологический состав всего сообщества.

Таким образом, в результате инфильтрации аэрируемых подземных вод в водоносный горизонт, периодической смены инфильтрационно-заборных режимов и смешения подземных вод из различных скважин в наземном оборудовании (ДК и РЧВ) происходит селекция адаптированных к стрессу бактерий. При сукцессии МК на разных этапах водоподготовки и усилении защитных механизмов, формируются устойчивые, многовидовые и сложно структурированные бактериальные сообщества с широким спектром потребностей и трофических возможностей. В РЧВ в составе биопленок, помимо бактерий и актиномицетов, могут развиваться простейшие, взаимодействующие в трофической цепи с микробным сообществом по принципу хищник-жертва, обеспечивая круговорот питательных веществ. Недостаточная оценка рисков, связанных с функционированием биопленок и возможностью их негативного влияния на реализацию технологии обезжелезивания, может привести к ухудшению органолептических показателей качества питьевой воды и повреждению технологического оборудования при применении дезинфицирующих средств для борьбы с обрастаниями.

Список литературы:

1. Mc.Donough LK, O’Carrol DM, Meredith K, Andersen MS, Brugger C. Changes in groundwater dissolved organic matter character in acoastal sand aquifer due to rainfall recharge. Water research. – 2020. 169:115201.

2. Кармалов А.И., Филимонова С.В. Анализ причин коагуляции и коррозии оборудования водозаборных скважин в условиях повышенной техногенной нагрузки// Водоснабжение и санитарная техника. – 2011. – № 9. – С. 16–20.

3. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма?// Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149-163.

4. Кулаков В.В., Кондратьева Л.М. Биогеохимические аспекты очистки подземных вод Приамурья. Тихоокеанская геология. – 2008. – 27(1). – С. 109–118.

5. Braun B., Schroder J., Knecht H., Szewzyk U. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system. Water Res. – 2016. – 107(15). – P.113–126. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.040>

СРАВНЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРОКАРИОТ МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА СВЕТЛОЕ НА ОСНОВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНА 16S рРНК

Т.И. Ловдина²²⁴

Меромиктическое озеро характеризуется недостаточным вертикальным перемешиванием между верхним слоем миксолимнионом и нижним слоем монимолимнионом, что является причиной сильных химических градиентов солености, содержания растворенных газов (кислород, сероводород, метан и другие) и питательных веществ на глубине хемоклина, то есть в переходной зоне между миксолимнионом и монимолимнионом [1]. Все эти особенности стратифицированных озер влияют на экологию, биологию и на стабильность меромиксиса, что делает актуальным изучение разнообразия и роли прокариот меромиктических озер для понимания как современных, так и древних водных экосистем.

Одним из уникальных меромиктических озер является озеро Светлое (Архангельская область; N 65 °04, E 41 °06), которое относится к редкому типу пресноводных меромиктических озер железо-марганцевого типа и является современным аналогом древнего архейского раннепротерозойского океана. Изучение его гидрологических и химических характеристик ежесезонно ведется с 2009 года, однако таксономическая идентификация прокариот озера путем метагеномного секвенирования была проведена трижды: в апреле 2014 [2], в мае 2016 [3] и в апреле 2021 [4].

Проведенные в 2014 году Саввичевым А.С. с соавторами [2] исследования выявили значительное разнообразие бактерий хемоклина озера Светлое. Самыми распространенными по полученным результатам метагеномного анализа по гену 16S рРНК являются *Betaproteobacteria* (55%), *Cyanobacteria* (24%), *Gammaaproteobacteria* (12%). Меньше 10% составляют бактерии класса *Chlorobia*, по 1% классы *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*.

Более полные исследования микробиологического разнообразия были проведены в 2016 году Каллистовой А.Ю с соавторами [3]. Исследователями методом высокопроизводительного пиросеквенирования участков V3-V6 гена 16S рРНК на платформе

GS FLX (Roche 454) было получено таксономическое разнообразие прокариот озера Светлое. В настоящее время все чаще применяют альтернативную технологию секвенирования - реверсивную терминацию. Так, в апреле 2021 года коллективом ученых ФИЦКИА УрО РАН [4] проводился метагеномный анализ разнообразия прокариот хемоклина и монимолимниона по последовательности гена 16S рРНК (участок V3-V4) методом реверсивной терминации на платформе MiSeq (Illumina).

Несмотря на сложность в проведении сравнений между результатами в виду специфики секвенирования, различий в методах выделения тотальной ДНК и ее амплификации, была проведена попытка соотнести результаты таксономического распределения прокариот хемоклина и монимолимниона озера Светлое в зависимости от участков прочтения гена 16S рРНК, полученные в 2016 и 2021 годах. Установлено, что пиросеквенированием было произведено 8571 прочтение генов прокариот хемоклина (23 метра) и 11458 – прокариот монимолимниона (33 метра). Секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) установило 21973 прочтения генов прокариот хемоклина (22,5 метра) и 47003 – монимолимниона (33 метра). Увеличение числа прочтений в несколько раз, вероятно, вызвано длиной секвенируемых участков гена 16S рРНК. Сокращение количества прочитываемых участков приводит к снижению точности идентификации прокариот, но в тоже время увеличивается число определяемых таксонов. Еще одна особенность, выявленная в ходе анализа полученных результатов, полученных в 2021 году – количество неклассифицированных таксонов. Так, в хемоклине их число составило 21,9% и 44,7% в бескислородной зоне. Предполагаем, что они относятся к археям, так как Каллистова А.Ю. с соавторами в своей работе получили более широкое разнообразие именно этого царства. Например, типы *Pasearchaeota*, *Pasearchaeota* или *Woesearchaeot*, которые в нашем распределении не получены.

По результатам 2021 года, представители *Cyanobacteria* самые многочисленные глубине на 22,5 м (25%), которые на 24,8 % принадлежат к порядку *Synechococcales*. Установлено, что в работе Каллистовой А. в хемоклине число считываний гена 16S рРНК типа *Cyanobacteria* составляет в 5 раз меньше (5% от всех прокариот). Бактерии типа *Desulfobacterota*, обнаруженные в количестве 3,8% и 9,1% на 22,5 и 33 метрах, соответственно, не были идентифицированы секвенированием участков V3-V6 гена 16S рРНК. Наоборот, предыдущие исследования позволили обнаружить в хемоклине присутствие бактерий типов *Chlorobi* (9,1%) и *Parcubacteria* (7,4%).

Способность прокариотических сообществ озера к производству и деструкции метана, делает необходимым подробное изучение их разнообразия. Обнаруженные метаногенные археи рода *Methanosaeta* (*Methanothrix*) по сравнению с исследованиями 2016 года в монимолимнионе озера содержатся в концентрации в 8 раз меньше. Бактерии порядка *Methylophilales* рода *Methylophilus*, окисляющие метан и его производные в хемоклине, согласно более ранним исследованиям, составляет 1,3%, что в 2,5 раз меньше, чем в полученных нами результатах.

²²⁴ ФИЦ комплексного изучения Арктики им. Н.П. Лаверова УрО РАН, г. Архангельск
Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск

Таким образом, различные технологии секвенирования позволяют обширнее увидеть картину прокариотического разнообразия озера, которая так важна не только для изучения эволюционных биогеохимических процессов, но и для мониторинга состояния и прогнозирования влияния экологических и антропогенных факторов на меромиктические озера.

Результаты получены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Благодарим А.Ю. Каллистову за предоставление результатов метагеномного секвенирования.

Работа выполнена по теме ФНИР № 122011800149-3 «Комплексные исследования биотических и абиотических компонентов водных экосистем Субарктики и Арктики в условиях изменяющейся природной среды».

Список литературы:

1. Gulati R.D., Zadereev E. S., Degermendzhi A. G. Ecology of meromictic lakes. – Berlin : Springer, 2017. – 404 p.
2. Savvichev, A.S. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in an ice-covered, iron-rich meromictic lake Svetloe (Arkhangelsk region, Russia) / A. S. Savvichev [et al.] // Environmental Microbiology. – 2017. – Vol. 19. – No 2. – P. 659–672.
3. Kallistova, A. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake / A. Kallistova [et al.] // Aquatic Microbial Ecology. – 2019. – Vol. 82. – No 1. – P. 1–18.
4. Ловдина, Т.И. Анализ структуры микробных сообществ в пресноводном меромиктическом озере европейской субарктики – современном аналоге раннепротерозойского океана / Т. И. Ловдина [и др.] // Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ –2022 ; Тезисы докладов, 02.02.2022 г. – СПб: СПбГУ, 2022. – С. 15.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТОВ РОСТОСТИМУЛЯЦИИ ПРОБИОТИКА *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* НЕСКОЛЬКИМИ ПРИРОДНЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ

А.Э. Макарова²²⁵, Г.Ю. Юринова²²⁶, Ю.П. Джигоев²²⁷

Введение. Бактерий *Lactobacillus acidophilus* являются нормальной микрофлорой в полости рта, толстой кишке и влагалище человека. *L. acidophilus* используется в пищевой промышленности для изготовления ацидофилина и других ацидофильных напитков. Они также применяются в качестве лекарственных средств – пробиотиков, создающие неблагоприятные условия для жизнедеятельности кислото-чувствительных патогенных и условно-патогенных бактерий. Применение пробиотиков с каждым годом растет колоссальными темпами. Так, например, доход от их продаж в США составляет около 35 млрд долларов ежегодно. Поэтому, поиск эффективных методов ростостимуляции штаммов *L. acidophilus* с биотехнологически ценными свойствами приобретает особую актуальность в связи с высокой конкуренцией на перспективном рынке пробиотиков. Такими свойствами стимуляции роста пробиотиков обладают ряд полисахаридных соединений из класса пребиотиков. Одним из источников таких пребиотиков являются продукты из лиственницы сибирской (*Lárix sibirica* Ledeb). Они в настоящее время находят многогранное применение в пищевой промышленности, биомедицине, в сельском хозяйстве. Эти полисахаридные полимеры легко биоутилизируются в нижних отделах желудочно-кишечного тракта находящимися там лакто и бифидобактериями. Однако, такие полисахариды как: арабиногалактан, кверцетин, дигидрокверцетин и ардиксин при их культивировании на средах с лактобактериями изучены недостаточно. Они в сочетании с пробиотиками могут применяться при создании симбиотиков. Однако, еще мало исследований, в которых бы изучались влияние этих полисахаридных соединений в процессах стимуляции роста такого пробиотика как *L. acidophilus*.

Цель. Сравнительно оценить влияние биологически активных полисахаридов (арабиногалактана, дигидрокверцетина, кверцетина, ардиксина), получаемых из лиственницы сибирской (*Lárix sibirica* Ledeb) в процессах стимуляции роста при куль-

²²⁵ Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

²²⁶ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

²²⁷ Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

тивировании с *Lactobacillus acidophilus*, выделенными из пробиотических продуктов питания.

Материалы и методы. В работе использовались полисахариды: дигидрокверцетин (ДГК), арабиногалактан (АГ очищ.), кверцетин (КВ), ардиксин (АДК), лабораторно выделенными из лиственницы сибирской (*Lárix sibírica Ledeb*). Проведено их культивирование с коммерческим препаратом *Lactobacillus acidophilus* из сухого коммерческого препарата «НАРИНЭ» при 37 °С в течение 3 суток. В каждой дозе содержится не меньше 1х10⁹ КОЕ/г *L. acidophilus*. Для культивирования *L. acidophilus* использовали тиогликолевую среду (гидролизат казеина ферментативный - 15,0, экстракт пекарских дрожжей -5,0 г/л, натрий хлористый -2,5г/л, натрия тиогликолят -0,5 г/л, натрий углекислый- 0,8+/-0,2г/л, цистеин -г/л, агар -0,75г/л, глюкоза -5,0г/л), рН среды- 7,2). С помощью спектрофотометра (Nano Photometer P330, Implen) при длине волны 600 нм. были сняты показатели оптической плотности трехсуточных культур *L. acidophilus* в средах с ДГК различных концентраций, АГ, АДК, и КВ.

Результаты и обсуждение. Исследования по оценке ростостимуляции исследуемыми полисахаридными пребиотиками проводилось при культивировании в средах с *L. acidophilus* при разных их концентрациях: 31,6 мг/мл, 15,6 мг/мл и 7,9 мг/мл. Для количественного определения влияния данных концентраций ДГК на рост данной лактобактерий была измерена оптическая плотность. Полученные данные в виде графика представлены на рис. 1. Как видно, с ДГК с разными концентрациями (31,6 мг/мл, 15,6 мг/мл и 7,9 мг/мл) не было выявлено видимого роста (о.п. 0,018-0,019-0,018). Рост *L. acidophilus* незначителен и это, скорее всего, может свидетельствовать о ингибирующем действии пребиотика ДГК в этих концентрациях на рост лактобактерий.

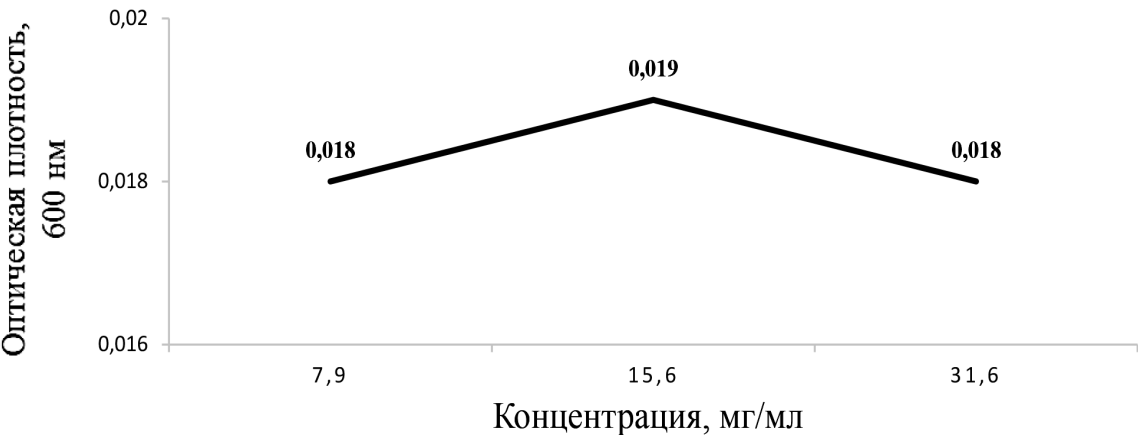


Рис. 1. График зависимости оптической плотности суспензии культивируемых *L. acidophilus* в среде от концентрации внесенного ДГК

Для количественного определения наиболее биологически активного пребиотика из трех исследуемых: КВ АДК и АГ также проводились их культивирование с *L. acidophilus* в тех же концентрациях: 31,6 мг/мл, 15,6 мг/мл и 7,9 мг/мл.Сравни-

тельно оценивались их эффективность на ростостимуляцию *L. acidophilus* методом оптической плотности в культуральной среде. Данные в виде диаграммы представлены на рис. 2, где ростовые характеристики *L. acidophilus* были следующими: с КВ рост был наиболее интенсивен (опт. пл. 0,603), с АДК и АГ был незначительным (опт. пл. 0,019 и 0,01, соответственно).



Рис. 2. Оптическая плотность культуральной жидкости, при культивировании коммерческого штамма *L. acidophilus* (1- АГ (0,01), 2-АДК (0,019), 3-КВ (0,603))

Заключение. В ходе исследования, по сравнительной оценке, эффективности влияния полисахаридных пребиотиков: арабиногалактана (АГ), ардиксина (АДК), кверцетина КВ), дигидрокверцетина (АДК), на стимуляцию роста пробиотического коммерческого препарата *L. acidophilus*, было показано неодинаковое воздействие этих пребиотиков. Так с пребиотиками ДГК, АГ и АДК стимуляция роста *L. acidophilus* была незначительной. Лишь пребиотик КВ показал наибольшую стимуляцию роста *L. acidophilus*, что указывает на его способность избирательно стимулировать рост и развитие лактобактерий. Полученные результаты являются первым экспериментальным вариантом исследования по оценке ростостимуляции пребиотических продуктов из лиственницы сибирской с пробиотиком *L. acidophilus*. Однако, необходимо отметить, что на сегодняшний день есть огромный потенциал получения новых пребиотических препаратов после глубокой химической переработки биомассы лиственницы сибирской. Также, из него в перспективе можно будет разработать новые инновационные медицинские и ветеринарные препараты, стимуляторы роста растений, биологически активные добавки к пище и новые композиционные материалы.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДВУХ ПУТЕЙ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА У ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *DESULFOTHERMOBACTER ACIDIPHILUS*

А.И. Мальцева²²⁸, А.Г. Ельченинов²²⁹, И.В. Кубланов²³⁰, Е.Н. Фролов²³¹

Цикл углерода является определяющим для биосферы Земли, важнейшим этапом которого является ассимиляция углекислоты автотрофными организмами. В настоящее время описано восемь путей фиксации CO₂, семь из которых встречаются только у прокариот. Согласно литературе, анализ геномных и метагеномных данных позволил выявить микроорганизмы, геномы которых содержат гены, кодирующие ферменты сразу двух путей фиксации CO₂. Так, для *Ammonifex degensii* (Bacillota) и *Ferroglobus placidus* (Euryarchaeota) было показано наличие генов, кодирующих ферменты как пути Вуда-Льюнгдаля, так и цикла Кальвина. Открытие обратимого цикла трикарбонового кислот существенно расширяет список микроорганизмов, потенциально содержащих два пути фиксации CO₂. Например, для бактерии *Thioflavicoccus mobilis*, являющейся эндосимбионтом морского червя Riftia, было показано наличие генов ключевых ферментов обратимого цикла трикарбоновых кислот и цикла Кальвина. Однако, в виду отсутствия биохимических, протеомных и микробиологических исследований микроорганизмов с двумя путями ассимиляции углекислоты, в настоящее время остаётся не ясным являются ли оба пути функциональными, работают они одновременно или же выбор пути зависит от внешних условий. Целью данной работы является исследование автотрофного роста сульфатредуцирующей термофильной бактерии *Desulfothermobacter acidiphilus* 3408-1^T, в геноме которой выявлены гены ключевых ферментов пути Вуда-Льюнгдаля и трансальдозного варианта цикла Кальвина.

Анализ генома термоацидофильной сульфатредуцирующей бактерии *D. acidiphilus* 3408-1^T, способной к автотрофному росту в присутствии водорода и сульфата, выявил наличие генов, кодирующих ключевые ферменты трансальдозного варианта цикла

Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля. Для ответа на вопрос о том, работают два пути одновременно, по отдельности или же функциональным является только один путь фиксации CO₂, нами был выполнен протеомный анализ. Биомассу *D. acidiphilus* 3408-1^T получали при культивировании в автотрофных условиях в присутствии водорода и сульфата (опыт) и в гетеротрофных условиях в присутствии глюкозы и сульфата (контроль). В обоих вариантах культивирование проводили в оптимальных условиях роста при 55°C и pH 4,5. Анализ протеомных данных показал, что все гены, кодирующие ферменты трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля, относились к числу up-regulated. Например, экспрессия трансальдозазы в автотрофных условиях увеличивалась в 8,7 раза, РубисКО в 4,9 раза, ацетил-КоА синтазы в 50,7 раз, а СО-дегидрогеназы в 16,8 раз. Полученные результаты свидетельствуют об одновременном участии цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля в ассимиляции углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1^T. С целью доказать функционирование именно трансальдозного, а не седогептулозобисфосфатного, варианта цикла Кальвина нами было произведено измерение активностей ключевых ферментов данного пути. Было установлено, что карбоксилазная активность РубисКО в клеточном экстракте *D. acidiphilus* 3408-1 составила 23,3 нмоль/мин/мг белка, активность фосфорибулокиназы – 12 нмоль/мин/мг белка, а трансальдозная активность составила 63 нмоль/мин/мг белка.

Протеомный анализ клеток, выращенных при 45 и 65°C, позволил оценить влияние температуры на вклад того или иного автотрофного пути в общую ассимиляцию углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1^T. Было показано, что значительного изменения экспрессии ключевых генов пути Вуда-Льюнгдаля при изменении температуры не происходило. Для ферментов цикла Кальвина изменение температуры оказывало влияние лишь на экспрессию генов тех ферментов цикла, которые также принимают участие в центральном метаболизме углеводов, но не на экспрессию гена РубисКО – ключевого фермента цикла Кальвина. Таким образом, в ассимиляции углекислоты у *D. acidiphilus* 3408-1^T одновременно принимают участие как цикл Кальвина, так и путь Вуда-Льюнгдаля. При этом температура окружающей среды не оказывает значительного влияния на изменение вклада конкретного автотрофного пути в общую ассимиляцию углекислоты.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-12031 ННИО_а.

²²⁸ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН (пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, Москва, 117312, Россия). E-mail: anasty.maltseva@gmail.com

²²⁹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН

²³⁰ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН

²³¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр Фундаментальных основ биотехнологии РАН

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ ЖЕЛЕЗО- И МАРГАНЕЦОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВАХ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ФИТОМЕЛИОРАЦИИ

Е.С. Мартыненко²³²

Формирование Fe-Mn конкреций является одним из механизмов самоочищения почв. Наиболее распространенным видом конкреционных новообразований почв, сформированных в условиях гумидного климата, являются ортштейны (Зайдельман и др., 2001). Использование почв в сельскохозяйственном производстве сопровождается активизацией формирования почвенных ортштейнов (Тимофеева, Голов, 2007). Фитомелиорация является эффективным приемом для улучшения плодородия почв.

Цель исследования, изучить распределение культивируемых форм железо- и марганцеокисляющих микроорганизмов в ортштейнах и мелкозем вместиющих горизонтов почв подверженных фитомелиорации.

В работе использовали образцы пяти почвенных горизонтов почвы, подверженной фитомелиорации, из которых отобраны конкреции трех размерностей: 1-2мм; 2-3мм; 3-5мм и почвенный мелкозем вместиющих горизонтов.

В результате исследований из почвенного мелкозема всех пяти вместиющих горизонтов исследуемых почв, культивированы как железо-, так и марганцеокисляющие микроорганизмы (FeMO и MnMO, соответственно). Установлено преобладание MnMO, их количество снижается с глубиной залегания горизонтов в несколько раз: $233,6 \times 10^3$ и $139,2 \times 10^3$ КОЕ/г почвы в верхних горизонтах (PU-ELnn (11–27 см) и ELnn (27–49 см), соответственно), против 35×10^3 КОЕ/г почвы в нижележащем BTnn, g (49–83 см). Наибольшее количество FeMO отмечено в верхнем горизонте профиля PU (0–11 см), наименьшее – в среднем ELnn (27–49 см) горизонте (26×10^3 и 1×10^3 КОЕ/г почвы, соответственно), далее с глубиной отмечается увеличение их количества до $4,3 \times 10^3$ КОЕ/г почвы в горизонте BTg (83–112 см).

Из ортштейнов также культивированы FeMO и MnMO, вторые всегда количественно преобладали над первыми не зависимо от размера ортштейнов.

Так, в ортштейнах размерностью 1-2мм обнаружены только MnMO. При этом, наибольшее их количество выделено из ортштейнов горизонта ELnn (27–49 см), а наимень-

шее из горизонта BTnn, g (49–83 см) ($134,4 \times 10^3$ КОЕ/г ортштейнов, $5,2 \times 10^3$ КОЕ/г ортштейнов, соответственно).

В размерности 2–3 мм наибольшее количество MnMO ($201,6 \times 10^3$ КОЕ/г ортштейнов) выделено из ортштейнов горизонта ELnn (27–49 см). FeMO (16×10^3 КОЕ/г ортштейнов) культивированы из ортштейнов только верхнего горизонта (0–11 см).

Из ортштейнов размерности 3–5мм наибольшее количество MnMO ($172,8 \times 10^3$ КОЕ/г ортштейнов) отмечено в горизонте PU (0–11 см). Наименьшее количество ($16,1 \times 10^3$ КОЕ/г ортштейнов) – в ортштейнах горизонта BTnn, g (49–83 см). FeMO в количестве 9×10^3 КОЕ/г ортштейнов культивированы только из ортштейнов верхнего горизонта (0–11 см).

Таким образом, установлено, что в почвах, подверженных фитомелиорации наибольшее количество FeMO и MnMO приходится на мелкозем вместиющих горизонтов. Ортштейны менее богаты FeMO, количество их снижается с глубиной залегания горизонтов. При этом и в ортштейнах, и в мелкоземе, вместиющих горизонтов, преобладают MnMO.

Список литературы:

1. Зайдельман, Ф. Р. Генезис и диагностическое значение новообразований почв лесной и лесостепной зон / Ф. Р. Зайдельман, А. С. Никифорова. – М. : МГУ им. М.В. Ломоносова, 2001. – 216 с.
2. Тимофеева, Я. О. Железомарганцевые конкреции как накопители тяжелых металлов в некоторых почвах Приморья / Я. О. Тимофеева, В.И. Голов // Почвоведение. – 2007. – №.12. – С.1463–1471.

²³² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, г. Владивосток, Россия

ВЛИЯНИЕ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *LUMBRICUS TERRESTRIS* НА ОБРАЗОВАНИЕ ЗАКИСИ АЗОТА МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ АГРОДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ

М.Н. Маслов²³³, Л.А. Поздняков²³⁴, А.А. Астайкина²³⁵

Закись азота (N_2O) является важным парниковым газом, способным взаимодействовать с озоном стратосферы и имеющим длительный, до 150–180 лет, срок пребывания в атмосфере. Более 65% всей образующейся в наземных экосистемах N_2O образуется в почве в результате ряда микробиологических процессов, наиболее важными из которых являются нитрификация и денитрификация. Интенсивность образования N_2O в почве зависит от многих факторов (температура, влажность, доступность источников азота и органического вещества и т.д.) и может регулироваться не только составом и активностью почвенной микробиоты, но и почвенными животными. Одной из наиболее распространенных групп почвенных беспозвоночных являются дождевые черви, в частности вид *Lumbricus terrestris*. Ранее было установлено, что в большинстве случаев активность дождевых червей приводит к увеличению доступности почвенного азота, а также лабильного органического вещества, что создает благоприятные условия для микроорганизмов, продуцирующих N_2O . Кроме того, анаэробные условия в желудочно-кишечном тракте дождевых червей благоприятны для поддержания разнообразия денитрифицирующих микроорганизмов, численность которых в этой нише может быть значительно выше, чем в окружающей почве. В тоже время, роль дождевых червей в регулировании эмиссии закиси азота из почв при разных уровнях внесения минеральных азотных удобрений до сих пор не была установлена.

Влияние дождевых червей на эмиссию закиси азота из почвы определялось в 30-дневном лабораторном эксперименте. Лабораторные микрокосмы были наполнены образцами среднесуглинистой агродерново-подзолистой почвы (Albic Retisol). Было заложено 3 варианта опыта: контроль, в котором для увлажнения почвы использовали деионизированную воду, вариант с низкой нормой внесения азотных удобрений, в котором для увлажнения использовали раствор NH_4NO_3 (из расчета 50 кг N/га), а также вариант с высокой нормой внесения азотных удобрений (из расчета 200 кг N/ га). Каж-

дый вариант опыта включал в себя 4 повторности без дождевых червей и 4 повторности с дождевыми червями (3–4 взрослых особей *L. terrestris* из расчета 10–12 г сырой биомассы червей на микрокосм). Перед началом инкубации, а также через 14 суток инкубации на поверхность почвы вносили 1.5 г измельченного сухого листового опада *Acer platanoides* для обеспечения дождевых червей питанием в ходе эксперимента. Инкубацию микрокосмов проводили при постоянной температуре +16 °C в темноте.

Оценку эмиссии закиси азота с поверхности почвы проводили ежедневно. Перед началом инкубации, а также на 7, 14, 21 и 28 сутки эксперимента в почве определяли содержание углерода и азота микробной биомассы, аммонийного и нитратного азота, количество копий генов *nirK* и *nirS*, кодирующих нитритредуктазу – один из ключевых ферментов процесса денитрификации. В конце инкубационного эксперимента (на 30 сутки) проводили вскрытие дождевых червей (согласно ранее опубликованному протоколу – [3]). Препараты ДНК были выделены из образцов почвы и кишечного тракта червей с помощью наборов реактивов FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, США) согласно методике производителя. Количество копий генов *nirK* и *nirS* оценивалось методом количественной ПЦР.

Было установлено, что внесенная доза минерального азотного удобрения и присутствие дождевых червей оказывали значимое ($p < 0.05$) влияние на эмиссию закиси азота почвой. Эмиссия N_2O почвой (без червей) увеличивалась в 4 раза (при внесении азотного удобрения из расчета 50 N кг/га) и в 10 раз (при внесении удобрения из расчета 200 N кг/га) по сравнению с контролем. Увеличение эмиссии N_2O при применении минеральных азотных удобрений связано с повышением содержания нитратного азота, что стимулирует процесс денитрификации [2], промежуточным продуктом которого является закись азота. Присутствие в почве червей существенно (в 10–100 раз) увеличивало эмиссию N_2O , но эффект зависел от дозы внесенного минерального азотного удобрения: наиболее существенное увеличение (в 90–100 раз по сравнению с вариантом опыта без червей) эмиссии закиси азота было зафиксировано в контрольном варианте без внесения удобрений, а наименьшее увеличение (в 10–12 раз по сравнению с вариантом опыта без червей) – при внесении максимальной нормы минерального удобрения. В контрольном варианте увеличение эмиссии закиси азота в присутствии червей связано с их участием в минерализации органических азотсодержащих компонентов растительного опада и почвы [4], а также обогащением почвы азотсодержащими прижизненными выделениями червей (мукус, мочевины, аллантоин, мочевиная кислота и др.). Фекалии дождевых червей также представляют собой локус для развития денитрификаторов за счет своей анаэробности, нейтрального значения pH, а также высокого содержания лабильных соединений углерода и азота. Применение минеральных азотных удобрений снижает роль дождевых червей в регулировании эмиссии закиси азота, поскольку, во-первых, повышается эмиссия N_2O из почвы без червей, а, во-вторых, высокие нормы применения азотных удобрений, вероятно, могут оказывать токсический эффект на дождевых червей.

Присутствие дождевых червей в почве значимо увеличивает содержание водорастворимого органического вещества ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, что проис-

²³³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²³⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²³⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ходит как за счет разложения растительного опада, который черви перераспределяют в почве, так и за счет их прижизненных выделений. Известно, что эмиссия закиси азота связана с доступностью источников органического вещества для микроорганизмов, т.к. высокое содержание доступной органики может подавлять финальные стадии денитрификации, увеличивая продуцирование N_2O почвой. Присутствие дождевых червей в почве также способствовало увеличению содержания углерода и азота микробной биомассы (в среднем на 25–40% по сравнению с вариантами опыта без дождевых червей). Дыхательная активность микробной биомассы, а также дыхание самих дождевых червей способствовали увеличению эмиссии углекислого газа в вариантах опыта с дождевыми червями, что создавало в почве анаэробные локусы, благоприятные для протекания процесса денитрификации [1, 4].

В течение инкубационного эксперимента количество копий генов *nirK* и *nirS* оставалось относительно постоянным (в контроле без внесения азотных удобрений) или плавно увеличивалось (в вариантах опыта с внесением азотных удобрений), однако присутствие дождевых червей в почве не оказывало статистически значимого изменения количества копий этих генов. В тоже время, количество копий генов *nirK* и *nirS* в содержимом кишечника *L. terrestris* было статистически значимо выше, чем в почве, что свидетельствовало о том, что инокуляция почвы денитрификаторами из кишечника дождевых червей потенциально возможна, однако этот процесс не является масштабным и черви выступают скорее в роли рефугиумов для денитрификаторов.

Таким образом, присутствие в почве дождевых червей *L. terrestris* способно усиливать образование N_2O вне зависимости от дозы внесения минеральных удобрений. Увеличение эмиссии закиси азота происходит не за счет резкого увеличения численности микроорганизмов-денитрификаторов в почве, а из-за повышения доступности органических субстратов, вызванной деятельностью дождевых червей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-016-00062 А).

Список литературы:

1. Маслов М.Н., Поздняков Л.А. Влияние внесения пожнивных остатков и минерального азотного удобрения на продуцирование закиси азота агродерново-подзолистой почвой // Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение. 2022. № 1. С. 52–58.
2. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007. 138 с.
3. Astaykina A., Streletskii R., Maslov M., Krasnov G., Gorbato V. Effects of three pesticides on the earthworm *Lumbricus terrestris* gut microbiota // Frontiers in Microbiology. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.853535.
4. Giannopoulos G., Pulleman M.M., van Groenigen J.W. Interactions between residue placement and earthworm ecological strategy affect aggregate turnover and N_2O dynamics in agricultural soil // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 618–625.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ rPPUT-TIK-1 ИЗ ШТАММА PSEUDOMONAS PUTIDA, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ

О.А. Маслова²³⁶

Исследование микроорганизмов многолетнемерзлых отложений представляет большой интерес как с точки зрения изучения эволюции бактерий, так и с точки зрения формирования принципов обращения с антибиотиками. Известно, что гены устойчивости к различным антибиотическим средствам существовали у бактерий и до антибиотической эры, однако с распространением использования антибиотиков в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и других отраслях появилось большое число панрезистентных штаммов бактерий. Важным фактором развития резистентности бактерий является горизонтальный перенос генов, основным участником которого являются плазмиды. Плазмиды, содержащие гены устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам, факторы вирулентности, а также модули конъюгации и мобилизации, определяют адаптационные возможности бактерий.

В данной работе были исследованы структура и свойства крупной конъюгативной плазмиды из штамма TIK-1 *Pseudomonas putida*, выделенного из многолетнемерзлых отложений.

Размер плазмиды rPPUT-TIK-1 составляет 153 678 п.н. нуклеотидов, содержание G+C 57 %. Анализ полной последовательности плазмиды с помощью BLAST показал, что она на 100% идентична плазмиде p420352-strA, выделенной из штамма *Pseudomonas putida* strain 15420352. Кроме того, 97 % последовательности rPPUT-TIK-1 имеет 100 % сходство с плазмидой из клинического штамма *Pseudomonas fulva* ZDHY414., что в очередной раз свидетельствует о тесной взаимосвязи природных и клинических плазмид.

Базовый район плазмиды rPPUT-TIK-1 содержит репликационный модуль и регион, отвечающий за конъюгацию (рис.1). В состав репликационного модуля входят гены *repA*, *repA1*, *parA*, *parB*. Ни один из генов репликации, *repA* и *repA1*, из rPPUT-TIK-1 не может быть отнесен ни к одной из известных групп несовместимости. Анализ базы данных с помощью BLAST позволил обнаружить 12 плазмид, содержащих такой же репликационный модуль. Девять из них содержат *tra*-оперон, а 4 – не содержат этих генов и со-

²³⁶ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

ответственно имеют меньшие размеры. Шесть из 12 плазмид выделены из клинических образцов, а остальные из различных природных источников.

Регион, отвечающий за конъюгацию (*tra*-оперон) у pPPUT-TIK-1 и родственных плазмид, содержит гены, кодирующие белки: TraY и TraM (белки, являющиеся частями релаксомомы), TraW, TraO и tTraU (белки, отвечающие за сборку пилей), TraN (белок взаимодействующий с поверхностью клетки реципиента, для стабилизации конъюгативной пары), и белки TraX, TraJ, TtrA также необходимые для работы системы секреции T4SS. Также pPPUT-TIK-1 и родственные ей крупные плазмиды содержат ген, кодирующий релаксазу MobA.

Дополнительный район плазмиды pPPUT-TIK-1 содержит гены отвечающие за устойчивость к ванкомицину, стрептомицину и ртути (рис 1.)

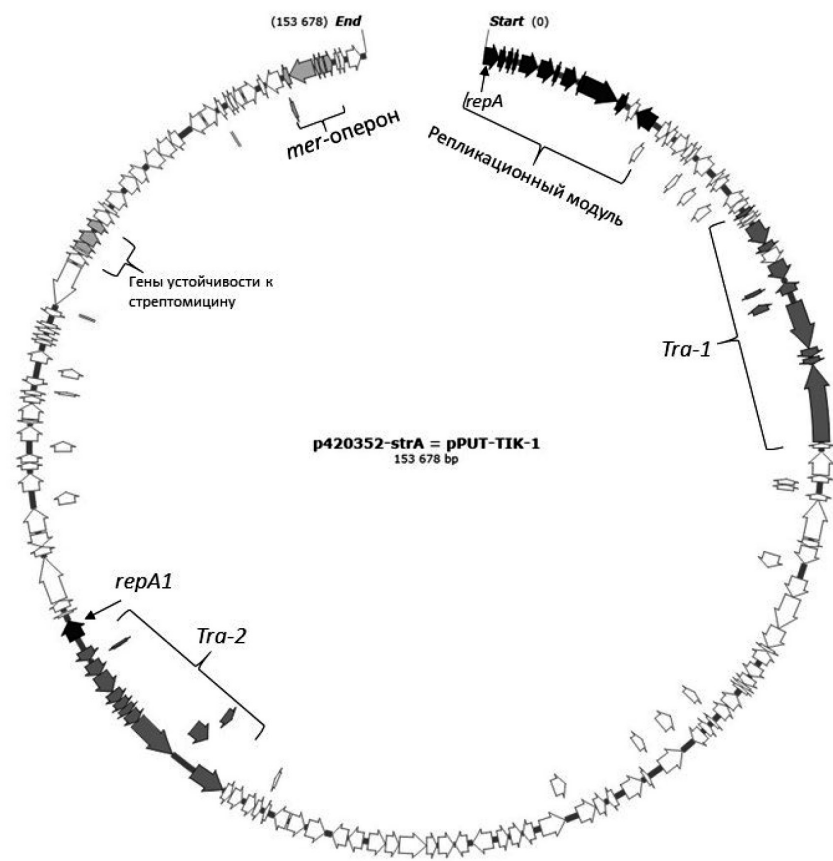


Рис. 2. Схема плазмиды pPUT-TIK-1

Опыты по определению круга хозяев плазмиды pPPUT-TIK-1 показали, что она с помощью конъюгационного переноса может передаваться в самые различные штаммы псевдомонад, в том числе, относящихся к видам филогенетически далеких от хозяйского штамма *P. putida* Tik1. Таким образом, плаزمида pPUT-TIK-1, несущая гены устойчивости к стрептомицину и солям ртути, потенциально может быть широко распространена, в том числе в клинике. Поэтому представляет интерес ее дальнейшее изучение.

ПОЛУРАЦИОНАЛЬНАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ ВИРУСНОГО КАНАЛЬНОГО РОДОПСИНА VirChR1 ПРИ ПОМОЩИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА

Г.А. Матвеев²³⁷, Е.Я. Подоляк²³⁸, Ф.М. Цыбров²³⁹, Д.В. Забельский²⁴⁰,
К.В. Ковалёв²⁴¹, А.А. Алексеев²⁴²

Аннотация. Ранее исследованный вирусный каналый родопсин VirChR1 демонстрирует уникальную непроницаемость для ионов Ca²⁺. Это помогает избежать влияния притока кальция при использовании белка для оптогенетической стимуляции, что делает его особо интересным для нейронаучных приложений. Однако способность VirChR1 стимулировать нейроны нарушена низкой фотопроводимостью. В данной работе выведен мутант eVirChR1, вызывающий значительно большие фототоки.

Оптогенетика – биотехнология, использующая свойства родопсинов – светочувствительных мембранных транспортеров – для целенаправленной активации нейронов светом [1]. В последнее десятилетие оптогенетическая стимуляция в живых организмах позволила подавлять приступы эпилепсии и частично восстанавливать утерянные зрение и слух [2, 3, 4]. Возможность селективной модуляции нервной активности сделала оптогенетику уникальной технологией с высоким потенциалом применения в науке и терапии.

Известно [5], что VirChR1 – катионный канал, непроницаемый для Ca²⁺. Это является важным свойством для конкретных приложений белка: кальций регулирует жизненные и сигнальные процессы в нейронах, и нарушение его концентраций нежелательно [6]. Использование VirChR1 поможет избежать побочных эффектов при оптогенетической терапии.

Возможность использовать родопсины в оптогенетике определяется их способностью модулировать нейронное возбуждение, что напрямую связано с плотностью фо-

²³⁷ Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия. E-mail: matveev.ga@phystech.edu
²³⁸ Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия
²³⁹ Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия
²⁴⁰ Европейский лазер на свободных электронах, Шенефельд, Германия
²⁴¹ Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия
Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбург, Германия
²⁴² Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия

тотока i_{ph} , обеспечиваемого белком. VirChR1 способен запускать потенциалы действия в нейронах [5], хотя активация ненадежна из-за малости фототока. Поэтому главная цель этого исследования – оптимизация VirChR1 путем мутагенеза для улучшения способности вызывать фототок.

Точечные мутации VirChR1 были подобраны опираясь на 3D-структуру вирусного родопсина OLPVRI, а также сведения о функциях некоторых аминокислотных остатков в канальных родопсинах. VirChR1 и OLPVRI считаются сходными по 3D-структуре из-за близости их первичных структур.

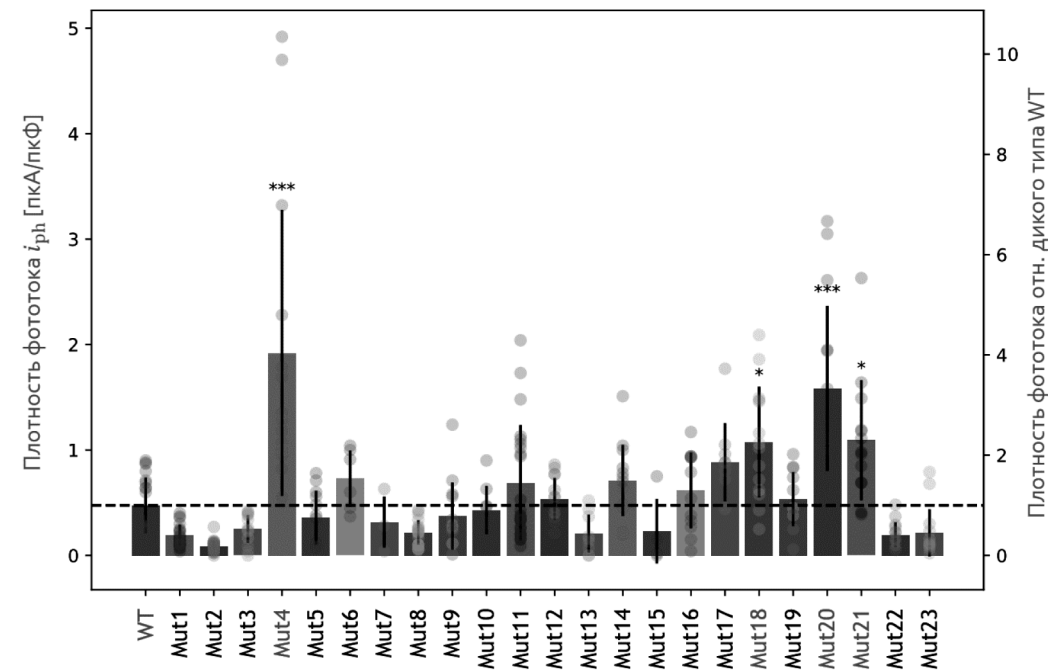


Рис. 1. Плотности фототоков мутантов (Mut1-23) VirChR1, измеренные на patch clamp

В работе представлены электрофизиологические параметры 23 мутантов VirChR1. Авторы сосредоточились на оценке их способности обеспечивать высокую плотность фототока (i_{ph} , рис. 1), кинетики релаксации (τ_{off} , рис. 2a) и специфичности ионной проводимости (наблюдаемой по потенциалу реверсии V_{rev} , рис. 2b).

Исследование позволило вывести мутанты с улучшенными качествами (Mut4, 18, 20, 21, см. рис. 1). Дальнейшее комбинирование этих мутаций привело к увеличению плотности возбуждаемых фототоков в получившихся вариантах белка (рис. 3). Способность мутанта eVirChR1 вызывать фототоки в 4-5 раз превышает таковую у дикого типа.

Дальнейшее исследование eVirChR1 заключается в проверке чувствительности к кальцию и улучшенной стимуляции нейронов. Эта работа поможет разработать родопсин с перспективными характеристиками для будущего использования в качестве нового оптогенетического инструмента.

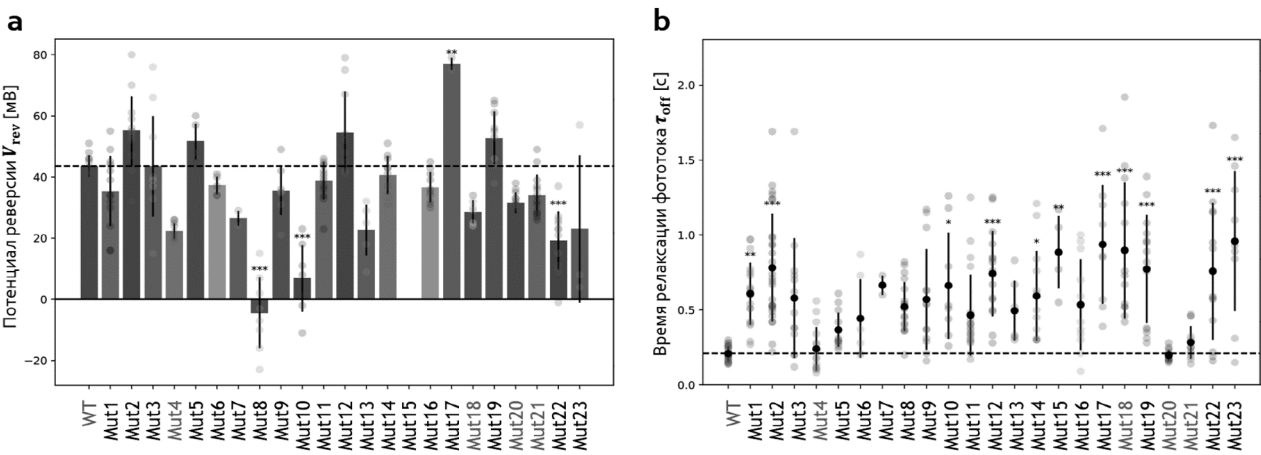


Рис. 2. Электрофизиологическая характеристика мутантов (Mut1-23) VirChR1: а, потенциал реверсии, б, время релаксации

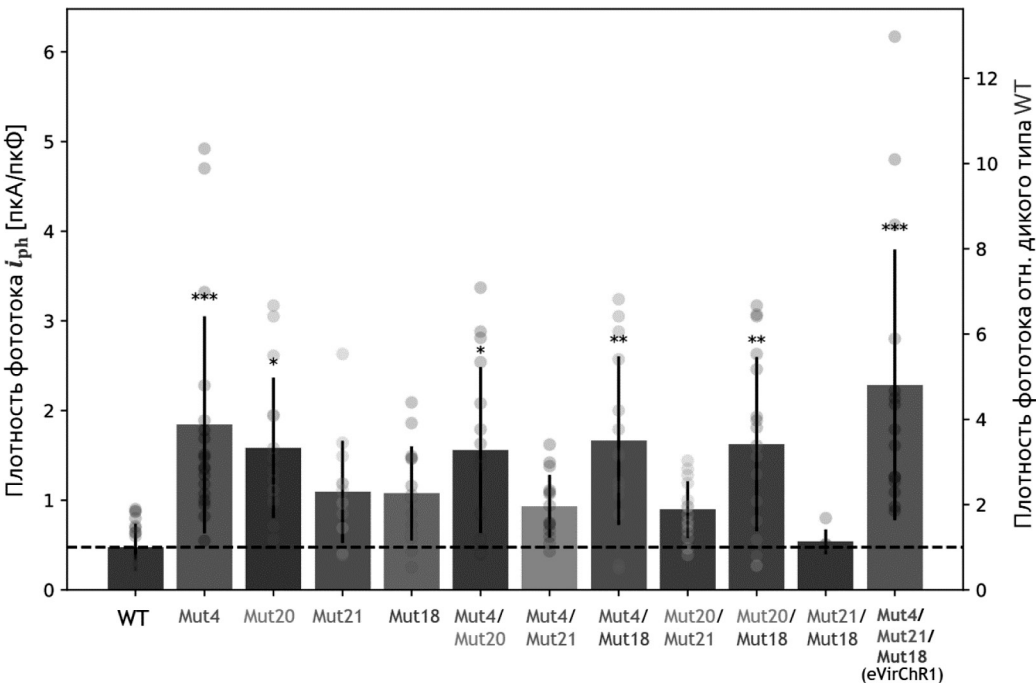


Рис. 3. Плотность фототоков мутантов VirChR1, полученных комбинированием «успешных» мутаций

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №21-64-00018, <https://rscf.ru/project/21-64-00018/>.

Список литературы:

1. Klapoetke, N. *et al.* Independent optical excitation of distinct neural populations // Nature Methods. 2014. V. 11. P. 338–346.
2. Paz, J. *et al.* Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury // Nature Neuroscience. 2013. V. 16. P. 64–70.

3. Keppeler, D. *et al.* Multichannel optogenetic stimulation of the auditory pathway using microfabricated LED cochlear implants in rodents // Science Translational Medicine. 2017. V. 12. P. 80-86.

4. Sahel, J. A. *et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy // Nature Medicine. 2021. V. 27. P. 1223–1229.

5. Zabelskii, D., Alekseev, A., Kovalev, K. *et al.* Viral rhodopsins 1 are an unique family of light-gated cation channels // Nature Communications. 2020. V. 11. P. 5707.

6. Brini, M. *et al.* Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. // Cell Molecular Life Science. 2014. V. 71. P. 787-814.

**СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЫСОКОЙ
ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ОКСИДАЗЫ
D-АМИНОКИСЛОТ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ
OGATAEA PARAPOLYMORPHA DL-1**

**И.О. Матюта²⁴³, Д.Л. Атрошенко²⁴⁴, Е.П. Сергеев²⁴⁵,
К.М. Бойко²⁴⁶, В.И. Тишков²⁴⁷**

FAD зависимые оксидоредуктазы представляют обширный класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, сопровождающиеся переносом электронов с молекулы субстрата на кофермент FAD. К этому классу ферментов принадлежат, в частности, оксидазы D-аминокислот (DAAO), которые катализируют окислительное дезаминирование D аминокислот в α-кетокислоты. DAAO выполняют важные функции в организмах различных доменов живой природы. В частности, в микроорганизмах DAAO участвует в катаболизме экзогенных D-аминокислот. В случае высших эукариот роль DAAO заключается в поддержании в клетке определенного уровня D-аминокислот, участвующих в регуляции таких жизненно важных процессов как функционирование нервной системы, старение, и др. Помимо этого, DAAO перспективен для применения в аналитической биотехнологии, хиральном синтезе, получении α-кетокислот. Отдельно стоит отметить, перспективность использования DAAO в системах диагностики и мониторинга нейродегенеративных заболеваний. Известно, например, что уровень D-серина в спинномозговой жидкости, который можно диагностировать с помощью DAAO, коррелирует с шизофренией и нейродегенеративными заболеваниями.

Исследуемая в настоящей работе DAAO термофильных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (OpaDAAO1) обладает высокой температурной стабильностью, что делает ее перспективной для биотехнологического применения. В то же время структурные основы высокой термостабильности этого фермента остаются невыясненными.

²⁴³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия

²⁴⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия

²⁴⁵ Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²⁴⁶ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия

²⁴⁷ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия
Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящей работе мы получили кристаллическую структуру OpaDAAO1 с разрешением 1.6Å. В кристалле белок представляет собой функциональный димер с классическим для оксидаз D-аминокислот фолдом и молекулой FAD, имеющей четкую электронную плотность. Проведен сравнительный анализ структуры OpaDAAO1, координации кофактора и остатков, потенциально отвечающих за высокую термостабильность фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации – грант № 075-15-2021-1354.

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ ПАУ У УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКВАТОРИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Е.А. Богатыренко²⁴⁸, А.В. Ким²⁴⁹, А.Д. Медведева²⁵⁰

Одной из основных проблем Японского моря является загрязнение нефтяными углеводородами (НУ) в связи с активно развитым судоходством, транспортировками нефти, а также хозяйственно-бытовыми и промышленными стоками [1]. Некоторыми авторами было отмечено, что достаточно большое количество видов морских микроорганизмов обладают способностью к деструкции НУ [2]. Значительную часть углеводородных компонентов сырой и очищенной нефти составляют полиароматические углеводороды (ПАУ) [3]. Мировые организации по охране окружающей среды оценивают ПАУ как новые приоритетные загрязнители, поскольку было показано, что они оказывают токсическое, канцерогенное, тератогенное и мутагенное воздействие на организмы [4].

Целью данной работы стало выявление маркерных генов, ответственных за деструкцию ПАУ, у углеводородокисляющих бактерий (УВОМ), выделенных из различных акваторий Японского моря.

Обзор литературы. ПАУ представляют собой соединения, состоящие из двух или более конденсированных, либо изолированных бензольных колец, соединенных в линейном, кластерном или угловом расположении. Наиболее распространенными ПАУ, встречающимися в различных фракциях нефти, являются нафталин и его гомологи, а также три- и тетрациклические структуры (фенантрен, антрацен, пирен и их гомологи) [3].

Первый этап деградации нафталина и других низкомолекулярных ПАУ осуществляется многокомпонентной ферментной системой нафталиндиоксигеназы. Ген *ndo* кодирует альфа-субъединицу железо-серного белка, отвечающего за субстратную специфичность всей ферментной системы [5]. В деградации нафталина может принимать участие фермент цис-нафталин-1,2-диоксигеназа, который катализирует превращение нафталина в цис-дигидро-1,2-нафталиндиол. Ген *narAa* кодирует большую субъединицу этого фермента и ген *narAb* – малую [6]. Также известны плазмидные гены диоксигеназы нафталина. Железо-серный белок таких диоксигеназ также состо-

²⁴⁸ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²⁴⁹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²⁵⁰ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

ит из двух субъединиц; гены *nahAc* и *nahA* гены кодируют альфа- и бета-субъединицы, соответственно [7]. Гены *Nah*, кодирующие фермент дигидродиолдегидрогеназу, организованы в два оперона: *nah1*-оперон контролирует превращение нафталина в салицилат, *nah2*-оперон – дальнейшую утилизацию салицилата через катехол до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Гены *Nah* представляет особый интерес как маркер деградации ПАУ, поскольку фермент, кодируемый этим геном, разрушает не только нафталин, но и фенантрен, антрацен, дибензотиофен и метилированные нафталины [8].

Генетический контроль начальных стадий деградации фенантрена был исследован у штамма *Burkholderia sartisoli* RP007, изолированного из загрязненных ПАУ почв. *Phn*-гены этого штамма имеют плазмидную локализацию и кодируют катаболизм фенантрена [9]. У ряда бактерий изучены ферментные системы, контролирующие разложение бифенила. Так, бифенил-2,3-диоксигеназа, кодируемая геном *BphA*, является ферментом, катализирующим первую реакцию окисления одного из ароматических колец бифенила [10]. Хорошо изучены гены, кодирующие все ферменты, обеспечивающие полное расщепление катехола, промежуточного продукта утилизации многих ПАУ. В частности фермент катехол-2,3-диоксигеназа, который превращает катехол в гидроксимуконный полуальдегд, кодируется геном *xylE* [11]. Группа генов *GN-PAH*, общая для всех граммотрицательных бактерий-деструкторов, детектируется праймерами, разработанными против различных типов аллелей, кодирующих альфа-субъединицу диоксигеназы, участвующей в начальном этапе аэробного метаболизма ПАУ (*nagAc*, *ndoB*, *pahAc*, *dntAc*, *arhA1*) [12].

Материалы и методы. Для исследования использовались пробы воды и донных отложений Японского моря. Посев проб производили методом Дригальского на плотную модифицированную среду Ворошиловой-Диановой с добавлением 2,5% стерильного флотского мазута. Полученные чистые культуры УВОМ использовали для всех последующих опытов. Экстракция ДНК проводилась коммерческим набором «ДНК-сорбент» согласно протоколу. Идентификацию УВОМ проводили на основе анализа структуры гена 16S рРНК с помощью пары праймеров 27F и 1350R. Продукты амплификации секвенировали по методу Сенгера на капиллярном приборе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. Для выявления у бактерий генов, ответственных за конверсию ПАУ, использовали известные праймеры на функциональные гены: *ndo*, *nahAc*, *xylE*, *phn*, *Nah*, *BphA*, *narAa*, *narAb*, а также на группу генов *GN-PAH* [6,7,10,11,12,13]. Все ПЦР-продукты визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Результаты. В ходе проведенной работы было выделено 47 штаммов бактерий, относящимся к трем филумам: Proteobacteria, Actinobacteria и Firmicutes. Все исследуемые гены деструкции ПАУ были детектированы у представителей семейства Pseudomonadaceae. У представителей семейства Moraxellaceae было обнаружено 7 исследуемых генов, а у представителей семейств Halomonadaceae, Enterobacteriaceae,

Yersiniaceae, Bacillidae и – по 5–6 генов. У представителей остальных выделенных семейств содержалось меньшее количество маркерных генов. У выделенных штаммов бактерий семейств Paenibacillaceae и Bacillaceae был детектирован всего лишь один маркерный ген, и в обоих случаях это был *Nah*.

Работа поддержана грантом РНФ проект № 19-74-00028.

Список литературы:

1. Доклад об экологической ситуации в Приморском крае в 2016 году. Доклад подготовлен во исполнение поручения Президента Российской Федерации от 06 декабря 2010 года №Пр–3534 по реализации Послания Президента Российской Федерации Федеральному Собранию Российской Федерации от 30 ноября 2010 года. – 2017. – 262 с.
2. Готтшалк, Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. – 310с.
3. Sahoo B.M., Ravi Kumar B.V.V, Banik B.K., Borah P. // Current Organic Synthesis Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs): Structures, Synthesis and their Biological Profile // Current Organic Synthesis. – 2020. V.17. P.1-16.
4. Qazi F., Shahsavari E., Prawer S., Ball A.S., Tomljenovic-Hanic S. Detection and identification of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in soil using intrinsic fluorescence // Environmental Pollution. – 2021. V.272. e116010.
5. Jeon C. O., Park M., Ro H.-S., Park W., Madsen E.L. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Pseudomonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control // Appl Environ Microbiol. – V.72. P.1086–1095.
6. Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M., van Beilen J.B., Cavalca L. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN // Environmental Microbiology. – 2000. – V.2. №5. P.572–577.
7. Park J.W., Crowley E. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils // Appl Environ Microbiol. – 2006. – V.72. №6. P.1322–1329.
8. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Кошелева И.А., Боронин И.А. Филогенетический анализ генов деградации нафталина и фенантрена у штаммов *Burkholderia* sp. // ГЕНЕТИКА. – 2013. Т.49. № 6. С.703–711.
9. Laurie A.D., Lloyd-Jones G. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism // Journal of Bacteriology. – 1999. – V.181. №2. P.531–540.
10. Шумкова Е.С., Плотникова Е.Г. Олигонуклеотидные праймеры для детекции генов, кодирующих большую субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, бактерий порядка Actinomycetales // Вестник Пермского университета. Серия: биология. – 2012. №1. С. 34–40.
11. Edlund A., Jansson J.K. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify psychrotolerant phenanthrene-degrading bacteria in phenanthrene-enriched polluted Baltic Sea sediments // FEMS Microbiology Ecology. – 2008. V.65. №3. P.513–525.

12. Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDα) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples // Journal of Microbiological Methods. – 2008. V.73. №2. P.148–159.

13. Ferrero M., Llobet-Bross E., Lalucat J., Garcia-Valdes E. et al. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in Pseudomonas strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. V.68. P.957–962.

УТИЛИЗАЦИЯ МАННИТА ФАКУЛЬТАТИВНЫМ МЕТИЛОТРОФОМ

METHYLOBREVIS PAMUKKALENSIS PK2

О.И. Мельников²⁵¹, О.Н. Розова²⁵²

Факультативный метилотроф *Methylobrevis pamukkalensis* PK2 является интересным объектом для изучения, благодаря своей способности расти на С6 сахарном спирте манните и ряде простых сахаров. D-маннит является наиболее распространенным полиолом в природе, а некоторые паразитические грибы синтезируют маннит на начальном этапе колонизации растений. Анализ генома *Mb. pamukkalensis* PK2 выявил небольшой кластер, включающий в себя гены транспортной системы маннита и маннит-2-дегидрогеназы (МТД), предположительно обеспечивающий ферментативную основу окисления маннита до фруктозы. Затем фруктоза фосфорилируется до фруктозо-6-фосфата фруктокиназой. Дальнейший же распад С6 фосфосахаров происходит по пути Энтнера-Дудорова, ключевые ферменты которого (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и КДФГ альдолаза), кодируются геномом, а их активность была обнаружена в бесклеточном экстракте (Poroshina et al., 2015). Тогда как при росте на метаноле ассимиляции С1 соединений у данного метилотрофа происходит через сериновый цикл.

В данной работе был получен гомогенный препарат рекомбинантной МТД, в отличие от других охарактеризованных ферментов, необратимо катализировавшей окисление маннита до фруктозы с восстановлением НАД⁺ до НАДН. Фермент является мономером с молекулярной массой 53 кДа. Максимальная активность МТД составила 136 Е/мг белка. Фермент работал в широком диапазоне рН от 8 до 11 с оптимумом рН 10,5. Температурный оптимум составил 50 °С. МТД – термостабильна, выдерживает нагрев до 50 °С без потери активности в течение 60 минут. При оптимальном рН и 30 °С значение Км для маннита составило (0,24 ± 0,027) мМ, для НАД⁺ – (0,035 ± 0,002) мМ.

В присутствии ионов двухвалентных металлов, таких как: Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ и Li²⁺ в концентрации 1 мМ, активности фермента снижалась на 27–41%, тогда как в присутствии Cu²⁺ увеличивалась на 20%. Присутствие в реакционной смеси одновалентных катионов (Na⁺, K⁺ и NH₄⁺) в концентрации 50 мМ не оказывало значимого влияния на активность МТД. Также было протестировано влияние различных интермедиатов

²⁵¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, Россия. E-mail: oleg96mel@gmail.com

²⁵² ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, Россия. E-mail: rozovaolga1@rambler.ru

на активность МТД. Оказалось, что фосфоенолпируват в концентрации 1 мМ выступает в качестве умеренного ингибитора МТД, снижая её активность на 30%. С другой стороны, сукцинат, гидроксипируват, глюкоза-1,6-бисфосфат, АДФ, фумарат, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, глюкоза-6-фосфат и АМФ увеличивали активность фермента на 30–50 %.

Выращивание *Mb. ramukkalensis* PK2 одновременно на метаноле и манните показало, что пути утилизации обоих субстратов функционируют параллельно и с относительно схожей эффективностью, о чем свидетельствуют данные скорости и объема использования субстратов относительно показателей роста культуры. Таким образом, можно говорить о полной независимости путей утилизации маннита и метанола. Однако, активность МТД отсутствовала в экстрактах клеток, выращенных на метаноле, тогда как при росте культуры на манните активность фермента в экстракте клеток составила 0,133 Е/мг белка. Данный факт может свидетельствовать о наличии регулятора индукции гена/оперона утилизации маннита.

С помощью гена контрселекции *sacB* был получен безмаркерный делеционный штамм по гену *mtlK*, кодирующему маннит-2-дегидрогеназу. Несмотря на отсутствие ключевого фермента окисления маннита, культура продолжала расти на данном субстрате. Поскольку *Mb. ramukkalensis* PK2 способен расти на простых сахарах (глюкозе, фруктозе, маннозе, ксилозе, арабинозе), вероятно, ферменты, ответственные за окисление данных субстратов, имеют неспецифическую активность и с маннитом. Таким образом, можно сделать вывод о наличии альтернативного пути, этапа или фермента, осуществляющего прямое или косвенное окисление маннита. Безмаркерный мутантный штамм *Mb. ramukkalensis* с полностью делетированной системой транспорта маннита, включающей в себя предположительно 4 гена, был не способен расти на манните. Следовательно, маннит проникает в клетки *Mb. ramukkalensis* за счет строго специфичной транспортной системы ABC типа.

КАТАБОЛИЗМ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ ШТАММОМ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2

Е.С. Морозова²⁵³, Е.В. Крючкова²⁵⁴

Коричная кислота и её производные, являясь вторичными метаболитами растений, а также промежуточными продуктами деградации лигнина, накапливаются в почве. Бактериальный катаболизм этих компонентов – важная часть углеродного цикла и путей деградации природных и промышленных ароматических соединений. Цель исследования – изучить деградационный потенциал по отношению к коричной кислоте и её производным штамма *A. insolitus* LCU2 и осуществить биоинформатический поиск генов, кодирующих ферменты деградации фенилпропаноидов.

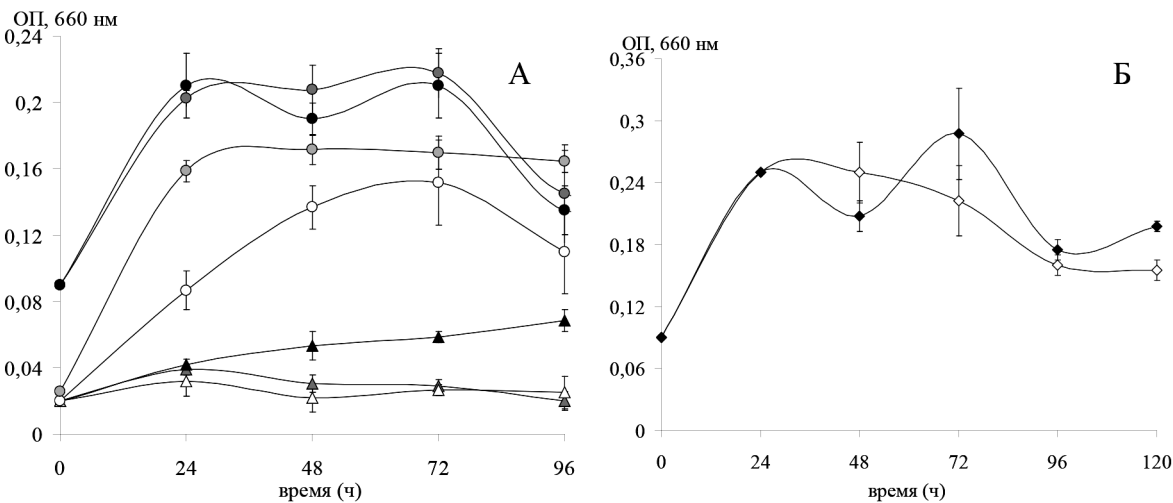
Бактерии выращивали в шейкере 130 rpm при 35°C на жидкой синтетической среде, с добавлением в качестве единственного источника углерода различных ароматических кислот: коричной и её о-, m- и p-замещённых производных, кофейной, ванилиновой и феруловой (0,5 г/л). Среда с соответствующими фенилпропаноидами без бактерий служила химическим контролем. Культуры, выращенные на яблочной кислоте (0,5 г/л), – биологическим контролем. Убыль и возможную трансформацию ароматических компонентов в процессе бактериального роста оценивали методом UV-спектроскопии Analytik Jena AG, Германия. Описанные ранее аминокислотные последовательности ферментов, катализирующих реакции деградации коричной кислоты, были экстрагированы из Uniprot и использованы для поиска гомологов в геноме LCU2 с помощью BLASTP. Для дальнейшей работы были отобраны аминокислотные последовательности, удовлетворяющие следующим критериям (покрытие >80%; E-value < 10⁻¹⁰; идентичность >20%), а также имеющие соответствующее геномное окружение.

К соединениям, поддерживающим рост *A. insolitus* LCU2, относились: коричная, феруловая, ванилиновая, кофейная кислоты. Кривые роста штамма LCU2 на коричной кислоте представлены на рисунке 1-А (круглые маркеры). На накопление биомассы влияли плотность засева и в меньшей степени концентрация источника углерода. Бактериальные культуры с начальной плотностью 0,02 увеличивали ростовые показате-

²⁵³ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

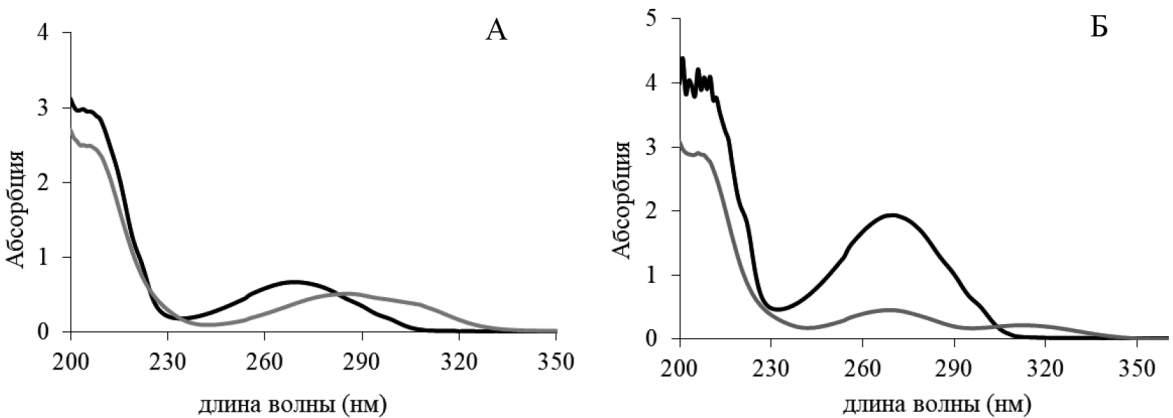
²⁵⁴ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, Россия

ли, в частности ОП_{660 нм}, в 7,5 на 0,5 г/л коричной кислоты и в 8,5 раз на 1 г/л (белые и светло-серые маркеры). Ростовые характеристики в вариантах с плотностью засева 0,09 на обеих концентрациях увеличивались только в 2,5 раза (чёрные и тёмно-серые маркеры). На замещённой м-кумаровой кислоте наблюдался слабый рост, и отсутствие роста на о- и р-кумаровых кислотах в течение 96-ти часов культивирования (Рис.1 треугольные маркеры). Рост на феруловой и ванилиновой кислотах, являющихся метаболитами коричной кислоты, представлен на рисунке 1-Б. Зафиксировано увеличение ОП_{660 нм} примерно в три раза.



А–круглые маркеры–коричная кислота: белые (0,5 г/л) начальная плотность засева 0,02; серые (0,5 г/л) начальная плотность засева 0,09; светло-серые (1 г/л) начальная плотность засева 0,02; чёрные (1 г/л) начальная плотность засева 0,09; треугольные маркеры–производные коричной кислоты: белые–п-кумаровая, серые–о-кумаровая, чёрные–м-кумаровая кислоты; Б–чёрные ромбы–феруловая кислота, белые ромбы–ванилиновая

Рис. 1. Рост *A. insolitus* LCu2 на различных фенилпропаноидах



А–коричная кислота 0,5 г/л; Б–коричная кислота 1,0 г/л; чёрный–химический контроль; серый–после двух суток роста *A. insolitus* LCu2

Рис. 2. UV спектры коричной кислоты

Чтобы оценить убыль и возможную трансформацию коричной кислоты в процессе бактериального роста были получены UV спектры супернатантов-рисунок 2. На спектрах химических контролей (чёрный) максимум поглощения наблюдался при 270 нм, после бактериального роста смещался к 287 нм (рис.2-А серый), или происходило значительное снижение интенсивности поглощения (рис.2-Б серый), что может быть вызвано снижением концентрации коричной кислоты в среде.

На сегодняшний день описано несколько путей бактериального катаболизма коричной кислоты: 1-β-окисление с образованием бензоата у *Cupriavidus necator* (Pérez-Pantoja et al., 2008); 2-гидроксилирование монооксигеназами до протокатеховой кислоты (Monisha et al., 2018); 3-гидроксилирование негемовыми железосодержащими диоксигеназами с Риске доменом с образованием дигидродиола и его дальнейшим разложением (Diaz et al., 1998). В геноме LCu2 обнаружен кластер генов, отвечающий за третий путь деградации (*hcaA*, *hcaB* – гены, кодирующие две субъединицы (α и β) Риске диоксигеназы, а также гены, соответствующих ферредоксина *fdx* и ферредоксин редуктазы *fdr*). Частично найдены гены, кодирующие ферменты второго пути, (*fldZ* – циннамат редуктазы и *mhrA* – 3-(3-гидрокси-фенилпропионат/3-гидроксициннамат гидроксилазы). Гомологов к генам *pobA* – п-гидроксибензоат гидроксилазы и *pcaH* – протокатехоат-3, 4 диоксигеназы, разрушающей бензольное кольцо, не было обнаружено. Но геном LCu2 содержал различные гены, кодирующие диоксигензы (ДО), катализирующие разрыв ароматического кольца, в частности – две субъединицы гидроксикинон 1,2-ДО (*pnpCD*); дигидроксифенилаланин 4,5-ДО (*ugiD*); катехол 1,2-ДО (*catA*).

Полученные данные будут использованы для предсказания и более детального исследования биохимических путей деградации фенилпропаноидов и других ароматических компонентов штаммом *A. insolitus* LCu2.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ АНАЛИЗА КОНФОРМАЦИОННОЙ ДИНАМИКИ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ

Х.С. Мустафин²⁵⁵, П.И. Буслаев²⁵⁶, И.Ю. Гущин²⁵⁷

Моделирование методом молекулярной динамики дает возможности для изучения больших липидных систем и влияния на них различных внешних факторов, таких как температура или присутствие низкомолекулярных соединений. Как правило, молекулы липидов демонстрируют сложные конформационные изменения, с характерными временными масштабами от фемтосекунд до нескольких сотен наносекунд. Несмотря на широкое использование методов молекулярной динамики для исследования липидных систем, их конформационная динамика в основном изучалась качественно, а количественное описание динамики и конформаций липидов отсутствовало. В наших предыдущих работах было показано, как применение метода главных компонент (РСА) может помочь в изучении и получении количественного описания конформационной динамики отдельных молекул липидов [1,2]. Было показано, что такой подход позволяет определить и количественно описать основные коллективные движения липидных молекул вдоль главных компонент, оценить характерные временные масштабы и изучить влияние использования различных силовых полей и температуры на динамику липидных молекул при моделировании методом молекулярной динамики [3].

Целью данной работы было развитие метода анализа динамики липидов методом главных компонент. Мы представляем программное обеспечение с открытым исходным кодом PCALIPIDS для автоматического анализа и сравнения траекторий молекулярной динамики различных липидных систем [4]. Продемонстрировано использование PCALipids для оценки влияния таких факторов, как температура, кривизна и концентрации холестерина, на конформационную динамику липидных молекул.

Список литературы:

1. Buslaev P. et al. Principal Component Analysis of Lipid Molecule Conformational Changes in Molecular Dynamics Simulations // J. Chem. Theory Comput. 2016. Vol. 12, № 3. P. 1019–1028.

2. I. Jolliffe, ‘Principal Component Analysis’, Springer, 2002

3. Buslaev P., Gushchin I. Effects of Coarse Graining and Saturation of Hydrocarbon Chains on Structure and Dynamics of Simulated Lipid Molecules // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 11476.

4. Buslaev P., Mustafin K., Gushchin I. Principal component analysis highlights the influence of temperature, curvature and cholesterol on conformational dynamics of lipids // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2020. Vol. 1862, № 7. P. 183253.

²⁵⁵ Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия

²⁵⁶ Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия
Университет Йювяскюля, г. Йювяскюля, Финляндия

²⁵⁷ Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия

АНАЛИЗ *pht*-ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ
ОРТО-ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ
ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА РОДА
ARTHROBACTER

Ю.И. Нечаева²⁵⁸, Е.С. Корсакова²⁵⁹, Е.Г. Плотникова²⁶⁰

Сложные эфиры *орто*-фталевой кислоты (фталаты) представляют класс синтетических соединений, которые широко используются в качестве пластификаторов при производстве бумаги, пластмасс, текстиля, а также не пластифицирующих агентов в косметике и парфюмерии. Широкое производство и применение фталатов привело к их повсеместному распространению и накоплению в воде, почве, воздухе и донных отложениях. Известно, что фталаты оказывают неблагоприятное воздействие на экосистемы и здоровье человека, что обусловлено их высокой способностью биоаккумулироваться в тканях живых организмов. Наиболее перспективной стратегией предотвращения последствий загрязнения окружающей среды соединениями фталевой кислоты является микробная деструкция. В связи с этим актуально исследование бактериальных штаммов, способных к эффективной деградации, как сложных эфиров фталевых кислот, так и промежуточных продуктов их разложения. Одним из ключевых метаболитов разложения фталатов бактериями является *орто*-фталевая кислота [1].

В рамках настоящего исследования проанализирована полногеномная последовательность галотолерантного штамма *Arthrobacter* sp. SF27, депонированная в базу данных National Centre for Biotechnology Information (NCBI) под номером GCA_012952295. Ранее выявлена способность штамма *Arthrobacter* sp. SF27 использовать орто-фталевую кислоту (ОФК) в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии до 70 г/л NaCl в среде культивирования [2]. Проведен геномный анализ *Arthrobacter* sp. SF27 с целью поиска и аннотации генов, участвующих в деградации ароматических соединений, в частности ОФК. Для поиска и анализа генов использован сервис JGI IMG/M [3]. Гомологичные белки идентифицированы с помощью поиска в BlastP [4]. Анализ метаболических путей проведен с использованием KEGG [5].

²⁵⁸ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия
ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

²⁵⁹ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия
ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

²⁶⁰ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия
ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

В результате геномного анализа *Arthrobacter* sp. SF27 обнаружен кластер *pht*-генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в трансформации ОФК до протокатеховой кислоты (ПКК). Обнаруженный кластер имеет размер 6660 п.н. и включает в себя восемь *pht*-генов (таблица, рисунок).

Таблица

Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей (АКП)

Ген	Фермент	Длина АКП	Гомологичные белки, номер в базе данных GenBank, сходство (%)
<i>phtB</i>	фталат-3,4-цисдигидродиол дегидрогеназа	62	фталат-3,4-цис-дигидродиол дегидрогеназа [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16533, 97%; альдокеторедуктаза [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], WP_049786163, 96%
<i>phtAa</i>	фталат 3,4-диоксигеназа, α-субъединица	486	фенилпропионат диоксигеназа, α-субъединица [<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^T], SDR29222, 97%; фталат 3,4-диоксигеназа, α-субъединица [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16534, 94% диоксигеназа, гидроксиллирующая ароматическое кольцо, α-субъединица [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], RKO19621, 94%
<i>phtAb</i>	фталат 3,4-диоксигеназа, β-субъединица	201	3-фенилпропионат/циннамат диоксигеназа, β-субъединица [<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^T], SDR29231, 97%; 3-фенилпропионат/циннамат диоксигеназа, β-субъединица [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], WP_120693527, 92%
<i>phtU</i>	гипотетический белок	112	гипотетический белок [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], WP_169094770, 91%; гипотетический белок [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], ADX75139, 90%;
<i>phtAc</i>	фталат 3,4-диоксигеназа, ферредоксин	64	фталат 3,4-диоксигеназа, ферредоксин [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16536, 100%; 3-фенилпропионат/циннамат диоксигеназа, ферредоксин [<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^T], SDR29255, 89%
<i>phtAd</i>	фталат 3,4-диоксигеназа, ферредоксин редуктаза	410	фталат 3,4-диоксигеназа, ферредоксин редуктаза [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16537, 93% фталат 3,4-диоксигеназа, ферредоксин редуктаза [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], ADX75141, 92%
<i>phtC</i>	3,4-дигидроксифталат декарбоксилаза	191	3,4-дигидроксифталат декарбоксилаза [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16538, 94% 3,4-дигидроксифталат декарбоксилаза [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], ADX75142, 94%
<i>phtR</i>	регулятор транскрипции семества IclR	283	регулятор транскрипции семества IclR [<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3], WP_041653696, 90%; предполагаемый регулятор <i>pht</i> -оперона [<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B], AAK16539, 86%

Результаты анализа транслированных АКП штамма *Arthrobacter* sp. SF27, с использованием BlastP, показали их наибольшую гомологию с белками, кодируемыми *pht*-генами штаммов *Arthrobacter keyseri* 12B, *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117[†] и *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (таблица). При этом расположение *pht*-генов в кластерах у данных штаммов и у штамма *Arthrobacter* sp. SF27 полностью совпадает (рис. 1).



Рис. 1. Организация кластера *pht*-генов штамма *Arthrobacter* sp. SF27

На основании полученных данных можно предположить, что в разложении ОФК до протокатехата у *Arthrobacter* sp. SF27 участвуют 3 ключевых фермента: фталат 3,4-диоксигеназа, фталат-3,4-цис-дигидродиол дегидрогеназа и 3,4-дигидроксифталат декарбоксилаза. В клетках штамма *Arthrobacter* sp. SF27 ОФК окисляется фталат 3,4-диоксигеназой (*phtAa*, *phtAb*, *phtAc*, *phtAd*) до 3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталата, который затем дегидрируется фталат-3,4-цис-дигидродиол дегидрогеназой (*phtB*) до 3,4-дигидроксифталата, который затем декарбоксилируется 3,4-дигидроксифталат декарбоксилазой (*phtC*) до ПКК. Такой путь разложения ОФК описан для нескольких грамположительных бактерий-деструкторов ОФК [1]. Галотолерантный штамм *Arthrobacter* sp. SF27 представляет интерес для дальнейших исследований и, в перспективе, может быть использован в мероприятиях по восстановлению экосистем, подверженных загрязнению фталатами и другими ароматическими соединениями. Данное исследование дает первое представление о структурах генома штамма *Arthrobacter* sp. SF27, контролирующего разложение фталатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта №19-44-590011p_a.

Список литературы:

1. Hu, R. Bacteria-driven phthalic acid ester biodegradation: Current status and emerging opportunities // R. Hu [et al.] / Environment International. 2021. V. 154. P. 106560.
2. Плотникова, Е.Г. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* – деструкторы полициклических ароматических углеводородов/ Е.Г. Плотникова [и др.] // Экология. 2011. № 6. С. 459–466.
3. Chen, I.A. The IMG/M data management and analysis system v.6.0: new tools and advanced capabilities // I.A. Chen [et al.] / Nucleic Acids Research. 2021. V. 49, Iss. D1. P. 751–763.
4. Jacob, J. Mercury BLASTP: Accelerating protein sequence alignment // J. Jacob [et al.] / ACM Transactions on Reconfigurable Technology and Systems. 2008. V. 1, Iss. 2. P. 1–44.
5. Kanehisa, M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG // M. Kanehisa [et al.] / Nucleic Acids Research. 2014. V. 42. P. 199–205.

СТРАТЕГИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ В ТОРФЯНЫХ КРИОГЕННЫХ ПОЧВАХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

В.А. Никиткин²⁶¹, И.В. Луцаева²⁶², Н.Н. Терещенко²⁶³,
Э.Г. Никиткина²⁶⁴, Л.Г. Колесниченко²⁶⁵

Западная Сибирь, большая часть территории которой занята болотами, является уникальным объектом для проведения исследований микробных сообществ торфяных, в том числе и многолетнемерзлых, почв. О жизнеспособности бактерий, микромицетов и дрожжей, являющихся основными агентами, осуществляющими деструкцию и синтез органических веществ в торфяниках, обнаруженных на разных глубинах вплоть до подстилающей породы, свидетельствует их способность к росту на питательных средах (Головченко и др., 2008, 2019, Богданова и др., 2014).

Целью нашей работы явилось выявление стратегий распределения эколого-трофических групп микроорганизмов в торфяных криогенных почвах разных участков криолитозоны Западной Сибири. Полевые исследования проводили на плоско-бугристых торфяниках Ямало-Ненецкого автономного округа: 1) В районе международного стационара «Ханымей», расположенного на южной границе распространения многолетнемерзлых пород. Подробнее участок был описан ранее (Lojko et. al., 2017); 2) В 30 км от п. Губкинский «Северо-Комсомольский» ключевой участок, описанный ранее (Lojko et. al., 2017, Kolesnichenko et. al., 2019); 3) В районе пос. Пангоды; 4) В районе пос. Тазовский. Всего были исследованы образцы десяти разрезов многолетнемерзлых торфяников и трех разрезов торфяников, мерзлота в которых растаяла вследствие деятельности пожаров.

Для оценки вклада микробного сообщества торфяных мерзлотных почв в цикл азота учитывали численность аммонифицирующих микроорганизмов, трансформирующих азотсодержащие органические соединения до аммония, и микроорганизмов, предпочитающих минеральные формы азота. Для оценки вклада микробного сообщества торфяных мерзлотных почв в цикл углерода учитывали численность гумусоразрушающих микроорганизмов, олиготрофов и микроскопических грибов.

²⁶¹ Томский государственный университет, Томск, Россия

²⁶² Томский государственный университет, Томск, Россия

²⁶³ Томский государственный университет, Томск, Россия

²⁶⁴ Томский государственный университет, Томск, Россия

²⁶⁵ Томский государственный университет, Томск, Россия

На основе полученных данных было установлено, что численность микроорганизмов эколого-трофических групп значительно изменяется в ряду активный слой – надмерзлотный слой – многолетнемерзлый слой торфяной залежи. Активный слой торфяной мерзлотной почвы чаще всего выступает зоной оптимума для большинства эколого-трофических групп микроорганизмов: аммонификаторов, утилизаторов азотсодержащих неорганических веществ, олиготрофов, гумусоразрушающих микроорганизмов. Однако отмечено, что численность микромицетов в надмерзлотном слое почвы, выше, чем в остальных слоях, что может свидетельствовать о накоплении необходимого пула питательных веществ, благодаря наличию водоупора многолетнемерзлого грунта. В талых торфяниках разница между численностью микроорганизмов основных эколого-трофических групп в торфяных слоях существенно сглажена.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проекты № 20-34-90090 и № 18-05-60264 на оборудовании Уникальной научной установки «Система экспериментальных баз, расположенных вдоль широтного градиента» ТГУ.

Список литературы:

1. Головченко А. В. Запасы и структура микробной биомассы в торфяниках карстовых ландшафтов Тульской области / А. В. Головченко, Е. М. Волкова // Почвоведение. – 2019. – №3. – С. 370–376.
2. Головченко А.В. Микробиологические основы оценки торфяника как профильного почвенного тела / А.В. Головченко, Т.Г. Добровольская, Д.Г. Звягинцев // Вестн. Томского гос. педагогического ун-та. Сер. Биологические науки. – 2008. – Вып. 4(78). – С. 46–53.
3. Жизнеспособность бактерий в торфяниках / О. Ю. Богданова [и др.] // Почвоведение. – 2014. – № 4. – С. 466–472.
4. Changes in the palsa landscapes components in the West Siberian northern taiga 10 years after wildfires / L.G. Kolesnichenko [et. al.] // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – P.232.
5. Abrupt permafrost collapse enhances organic carbon, CO₂, nutrient and metal release into surface waters / S.V. Lojko [et. al.] // Chemical Geology. – 2017. – Vol.471. – PP.153–165.

ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ НА РАСТВОРЕННЫЙ ОРГАНИЧЕСКИЙ УГЛЕРОД В РАСТИТЕЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТАХ

Э.Г. Никиткина²⁶⁶, И.В. Луцаева²⁶⁷, В.А. Никиткин²⁶⁸,
Т.В. Раудина²⁶⁹, Л.Г. Колесниченко²⁷⁰

Бактериальная деградация растворенного органического вещества (РОВ) является основным драйвером выделения из водоёмов в атмосферу значительного количества CO₂, поэтому данные о влиянии деятельности гетеротрофных микроорганизмов на структуру растворённого органического вещества могут быть важны для оценки глобальных биогеохимических циклов и понимания регулирования обмена CO₂ между водоёмами и атмосферой (Shirokova et al., 2017 a, b). В связи с чем, целью исследования являлась экспериментальная оценка степени трансформации гетеротрофными бактериями РОВ и физико-химических свойств субстрата. Эксперимент имитировал условия половодья и позволил оценить вклад микроорганизмов в изменения структуры органического вещества водных объектов поймы.

В ходе эксперимента чистые культуры микроорганизмов, выделенные из водоемов поймы среднего течения р. Оби (штамм WK1, на 96% гомологичный *Pseudomonas jessenii* strain NBFPLINDS_RAS23, и штамм WK4, на 96% гомологичный *Microbacterium phyllosphaerae* strain Tibetlhz-19) помещали в стерильный фильтрат растительности, распространённой на территории пойменных биоценозов. Эксперимент проводили в климатической камере, в единых температурных условиях при постоянном насыщении кислородом.

Установлено, что в суспензии на 5 сутки эксперимента наблюдался скачок роста численности микроорганизмов в 3,6 раза относительно нулевой точки для штамма WK1 и в 5,7 раз для штамма WK4. Динамика показателя pH суспензии в присутствии обоих штаммов была схожей и имела тенденцию к снижению в первые трое суток эксперимента. Амплитуда значений pH в присутствии WK1 была всего 0,09, а в присутствии WK4 – 0,13.

Содержание растворённого органического углерода в экспериментальных образцах активно снижалось соответственно росту микроорганизмов в первые четверо суток

²⁶⁶ Национальный исследовательский Томский Государственный Университет, Томск, Россия

²⁶⁷ Национальный исследовательский Томский Государственный Университет, Томск, Россия

²⁶⁸ Национальный исследовательский Томский Государственный Университет, Томск, Россия

²⁶⁹ Национальный исследовательский Томский Государственный Университет, Томск, Россия

²⁷⁰ Национальный исследовательский Томский Государственный Университет, Томск, Россия

эксперимента, вероятно, вследствие потребления органического субстрата бактериями. Наблюдалась тенденция к увеличению значений показателя SUVA₂₅₄ (specific ultraviolet absorption), и, соответственно, ароматичности органического вещества. Очень низкие в целом значения данного показателя подтверждают, что присутствующие в экспериментальном фильтрате органические вещества имели не гумусовую природу и являлись преимущественно гидрофильными. Все выявленные изменения были более резкими в присутствии WK4 и менее амплитудными – в присутствии WK1. Благодарности. Исследование проведено в рамках проекта РНФ 18-17-00237-Р.

Список литературы:

1. Shirokova L. S., Bredoir R., Rolsc J.-L., and Pokrovsky O.S. Moss and Peat Leachate Degradability by Heterotrophic Bacteria: The Fate of Organic Carbon and Trace Metals // Geomicrobiology Journal 2017, V. 34, NO. 8, 641–655;
2. Shirokova L. S., Labouret J., Gurge M., Ge ´rard E., Ivanova I. S., Zabelina S. A., Pokrovsky O. S. Impact of Cyanobacterial Associate and Heterotrophic Bacteria on Dissolved Organic Carbon and Metal in Moss and Peat Leachate: Application to Permafrost Thaw in Aquatic Environments // Aquat Geochem (2017) 23:331–358.

**ПОИСК ФАГОВЫХ БЕЛКОВ,
ОСТАНАВЛИВАЮЩИХ РОСТ КЛЕТКИ,
НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИОФАГА PHIKZ**

**А.С. Ничипоренко²⁷¹, Д.А. Антонова²⁷², В.А. Касьянов²⁷³,
И.В. Курдюмова²⁷⁴, М.В. Якунина²⁷⁵**

Возрастающая устойчивость микроорганизмов к существующим антибиотикам считается одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества и продовольственной безопасности. Во всем мире наблюдаются высокие показатели резистентности среди распространенных бактериальных инфекций, что свидетельствует об истощении нашего арсенала эффективных антибиотиков. Так *Pseudomonas aeruginosa* обладает множественной устойчивостью к антибиотикам и является распространенной больничной инфекцией, поражающей людей с ослабленным иммунитетом [1].

Одной из критических задач современной науки является поиск альтернативных антимикробных веществ, в том числе и среди естественных врагов бактерий – бактериофагов. PhiKZ - бактериофаг литического типа, инфицирующий *P. aeruginosa*. Сразу после заражения литические бактериофаги захватывают молекулярный механизм своего бактериального хозяина, чтобы создать оптимальные условия для размножения фага и последующего лизиса клетки [2]. Ранее с помощью метода РНК-seq были определены его ранние гены, то есть гены, экспрессируемые в начале инфекции клеток [3]. Задачей данного исследования было изучить ингибирующие эффекты белков, кодируемых ранними генами бактериофага phiKZ, на клетки двух модельных бактериальных культур.

В соответствие с ранее описанными в литературе данными [2], из всех ранних генов фага phiKZ были отобраны короткие гены (до 1000 п.о.), количество транскриптов которых значительно снижается к средней стадии инфекции. Каждый ген был клонирован в шаттл-вектор pHERD20T, позволяющий проводить их экспрессию как в клетках *E.coli*, так и *P.aeruginosa*. Жизнеспособность клеток, содержащих плазмиду с геном, оценивали с использованием планшетного спектрофотометра в присутствии индуктора и без него. В качестве контроля использовались клетки с пустым вектором. Каждый образец был представлен тремя биологическим повторами. Съемка велась раз в 5 минут

²⁷¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
²⁷² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
²⁷³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
²⁷⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
²⁷⁵ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

в течение минимум 8 часов при 37 °С. Образцы бактерий с генами, экспрессия которых подавляла рост и деление, также анализировались с помощью микроскопии в присутствии флуоресцентного красителя Propidium Iodide, позволяющего выявить мертвые клетки.

Мы проанализировали 16 ранних белков бактериофага phiKZ. Было выявлено четыре ранних фаговых белка, останавливающих рост и деление клеток культур: *P. aeruginosa* штамм PAO1 и *E. coli* штамм DH5α. Флуоресцентная микроскопия показала, что экспрессия двух из этих генов вызывают гибель клеток. Далее нам предстоит выяснить, каким образом фаговые белки подавляют и убивают бактерии, с какими молекулярными мишенями взаимодействуют.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы «Приоритет 2030» (соглашение 075-15-2021-1333 от 30.09.2021).

Список литературы:

1. Losito, A.R. *et al.* New Drugs for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections with Limited Treatment Options: A Narrative Review. *Antibiotics (Basel)*. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11050579.
2. Wagemans, J. *et al.* Functional elucidation of antibacterial phage ORFans targeting Pseudomonas aeruginosa. *Cell Microbiol.* 2014, doi: 10.1111/cmi.12330.
3. Wicke, L. *et al.* Introducing differential RNA-seq mapping to track the early infection phase for Pseudomonas phage φKZ. *RNA Biol.* 2021, doi: 10.1080/15476286.2020.1827785.

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА,
КОДИРУЮЩЕГО ГЛЮКОАМИЛАЗУ
ИЗ RASAMSONIA EMERSONII,
В KOMAGATAELLA MONDAVIORUM**

И.А. Пантюшин²⁷⁶, Т.Л. Гордеева²⁷⁷, С.П. Синеокий²⁷⁸

Глюкоамилаза (1,4-α-D-глюканглюканогидролаза, ЕС 3.2.1.3) – фермент, который гидролизует α-1,4-гликозидные связи, взаимодействуя с невосстанавливающими концами цепей амилозы и амилопектина, с выделением β-D-глюкозы. Данный фермент имеет широкий спектр применения и активно используется в технологических процессах различных областей, таких как: производство спирта, производство хлебобулочных изделий, при производстве синтетических моющих средств и в целлюлозно-бумажной промышленности. Стадии технологического процесса требуют нагрева сырья, что говорит о необходимости наличия у фермента свойства термостабильности.

Продуценты ферментов на основе метилотрофных дрожжей рода *Komagataella* обладают ценными промышленными свойствами и широко используются на производстве. Однако высокоэффективных продуцентов глюкоамилаз на основе этих дрожжей пока не было сконструировано.

Целью исследования было клонирование и экспрессия гена *remGA*, кодирующего глюкоамилазу из *R. emersonii*, в *K. mondaviorum*, оценка продуктивности полученных трансформантов, а также характеристика рекомбинантного фермента.

В качестве реципента был выбран штамм *K. mondaviorum* Y-4331, обладающий высоким экспрессионным потенциалом. В качестве контрольного штамма использовали коммерческий штамм *Komagataella phaffii* GS115. Ген *remGA* был оптимизирован по кодоновому составу и синтезирован методом ПЦР с перекрывающимися праймерами. Ген *remGA* был клонирован в состав экспрессионного коммерческого вектора pPICZα по сайтам *EcoRI* и *AgeI* в единой рамке считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и под контролем PAOX1 промотора. В качестве селективного маркера использовали ген *BleoR* устойчивости к антибиотику зеоцину. В результате была получена экспрессионная интегративная плаزمиды pPICZ-GARe.

²⁷⁶ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

²⁷⁷ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²⁷⁸ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Полученная плазмида была линейаризована при помощи эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II и трансформирована в штаммы *K. mondavorum* Y-4331 и *K. phaffii* GS115 методом электропорации.

Было отобрано по 10 трансформантов каждого штамма-реципиента и произведено культивирование с индуцированием PAOX1 промотора посредством добавления метанола. Средняя продуктивность трансформантов на основе *K. mondavorum* Y-4331 в 2,4 раза превышала таковую для трансформантов *K. phaffii* GS115

Фермент проявлял активность в широком диапазоне температуры и pH с оптимальными значениями температуры 70 °C и pH 5. Определение термостабильности фермента проводили путем измерения его активности после инкубирования в диапазоне температур от 50 до 80 °C в течение 30 мин. Фермент сохранял 88% активности после инкубирования при температуре 70 °C.

Полученные результаты показывают, что рекомбинантная глюкоамилаза из *R. emersonii* обладает повышенной термостабильностью, а ген *remGA* эффективно экспрессируется в штамме *K. mondavorum* Y-4331, что открывает потенциальную возможность получения штаммов-продуцентов на основе данного штамма.

Работа выполнена с использованием уникальной научной установки – Биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (БРЦ ВКПМ).

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩЕГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО- ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

А.В. Пелевина²⁷⁹, Ю.Ю. Берестовская²⁸⁰, Е.В. Груздев²⁸¹,
В.В. Сорокин²⁸², О.В. Слатинская²⁸³, А.В. Марданов²⁸⁴

Фосфор – важнейший биогенный элемент, играющий ключевую роль в конструктивном и энергетическом метаболизме всех живых организмов. Он находит широкое применение в промышленности и сельском хозяйстве. Рост его добычи и использования привели к возникновению двух масштабных проблем: массовой эвтрофикации водоемов, вызванной увеличением сброса фосфора со сточными водами и опасности возникновения в ближайшие десятилетия глобального дефицита фосфора в связи с тем, что его запасы ограничены и невозобновляемы. Эти проблемы позволяют решить технологии очистки сточных вод от фосфора, основанные на биологической очистке с использованием активного ила, формирующегося в биореакторах непрерывного или последовательно-периодического действия (sequencing batch reactor, SBR).

Биологическое удаление фосфора осуществляют развивающиеся в активном иле очистных сооружений микроорганизмы, относящиеся к физиологической группе фосфат-аккумулялирующих организмов (ФАО). ФАО накапливают фосфор в виде внутриклеточных гранул полифосфата, образующихся при периодической смене аэробных и анаэробных условий.

Целью наших исследований было получение и изучение фосфат-аккумулялирующего микробного сообщества, развивающегося в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия.

В условиях циклического чередования аэробной и анаэробной фаз в биореакторе (частота цикла 6 часов) с ацетатом в качестве субстрата было получено устойчивое,

²⁷⁹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁸⁰ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁸¹ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁸² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²⁸³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²⁸⁴ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

обогащенное ФАО микробное сообщество, которое эффективно удаляло фосфор. Было выявлено 3 стадии развития этого сообщества.

На первом этапе (0–0 суток) происходила адаптация микробного сообщества ила к селективным условиям культивирования в реакторе и постепенное накопление фосфат-аккумулирующих организмов. Эффективность удаления фосфора на этом этапе была 35%.

На 40–400 сутки (второй этап) эффективность удаления фосфора возрастала и достигала 80%. Содержание в биомассе фосфора составляло $10.6 \pm 0.1\%$ сухого веса. Было установлено, что развитие сообщества происходило сформированием двух морфологически разных типов агрегатов (морфотип I и морфотип II) (рис.1 А, Б).

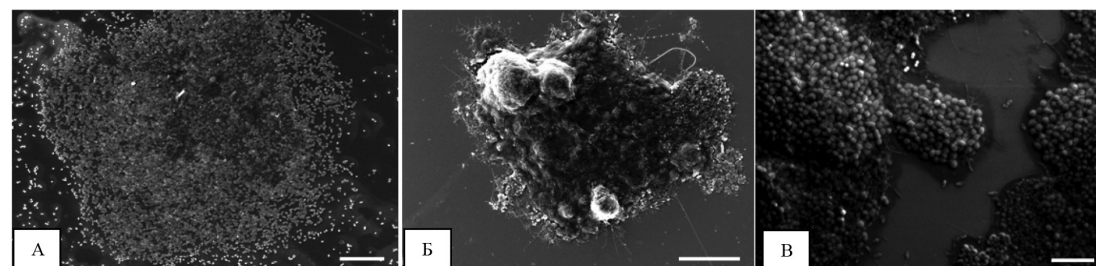


Рис. 1. Электронные микрофотографии агрегатов: А – морфотип I; Б – морфотип II, масштабная линейка – 50μm; В – морфотип III, масштабная линейка – 10μm

Агрегаты имели различия как по физической структуре, так и по микробному составу. В агрегатах морфотипа I доминировали типичные для очистных сооружений представители ФАО – *Ca. Accumulibacter* (39.5%), а также потенциальные ФАО – *Dechloromonas* и *Thiothrix* (3.77 и 5.35% соответственно). Также в сообществе присутствовали гликоген-аккумулирующие микроорганизмы (ГАО) семейства *Competibacteraceae* – *Ca. Competibacter*, которые считаются основными конкурентами ФАО за ацетат. Их доля была существенно меньше ФАО и составляла 8.28 %. ГАО способны к накоплению внутриклеточных полимеров (гликоген и ПГА), но не обладают способностью к накоплению полифосфатов. В агрегатах II морфотипа доминировали ГАО – *Ca. Competibacter*, доля которых составляла 31.87%. ФАО почти в равных долях были представлены организмами *Ca. Accumulibacter* и *Dechloromonas* (9.89 и 8.02% соответственно), а также нитчатым организмом *Thiothrix* (3.44%).

К 400 суткам до настоящего времени (третий этап) произошла селекция агрегатов микробного сообщества биореактора, в результате которой остался один тип агрегатов (морфотип III), ключевыми представителями в котором были ФАО *Ca. Accumulibacter* (рис.1 В). Эффективность удаления фосфора на этом этапе достигла 86%. Балансовый расчет показал, что большая часть ацетата использовалась фосфат-аккумулирующими организмами для накопления внутриклеточных полифосфатов.

Рентгеновский микроанализ элементного состава бактериальных клеток позволил установить химический состав включений и подтвердил наличие высокого содержа-

ния в них фосфора, калия и магния (рис. 2 А, Б). Анализ включений методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопии) показал, что полосы соединений фосфора в клетках соответствовали полосам гексаметафосфатанатрия 478 и 2435 cm^{-1} (рис. 2 В).

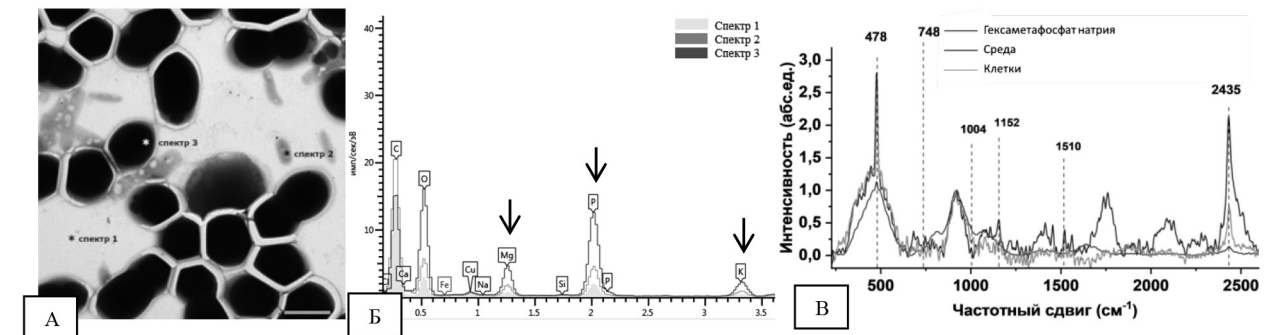


Рис. 2. А – Электронная микрофотография бактериальных клеток сообщества, масштабная линейка 5 μm; Б – элементный анализ; В – КР-спектры клеток с включениями. Представленные графики нормированы на максимум интенсивности полосы стекла – 916 cm^{-1}

Таким образом, в ходе работы биореактора было получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество с высоким накоплением фосфора в биомассе (16.5% от сухого веса беззольного вещества биомассы). Основным представителем ФАО в сообществе был *Ca. Accumulibacter*.

Работа финансировалась из средствРНФ № 21-64-00019 и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

РАЗНООБРАЗИЕ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ В СООБЩЕСТВАХ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИБРЕЖНЫХ АКВАТОРИЙ ПРИМОРСКОГО КРАЯ, ВЫЯВЛЕННОЕ В ХОДЕ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Т.И. Дункай²⁸⁵, Е.О. Писарева²⁸⁶, Е.А. Богатыренко²⁸⁷

Прибрежные акватории Приморского края имеют значительный природно-ресурсный потенциал, способствующий развитию рекреационного, лечебно-оздоровительного, хозяйственно-питьевого и культурно-бытового морского водопользования населения. Береговая зона является наиболее освоенной их частью и подвержена сильной антропогенной нагрузке, источником которой являются морские порты Владивосток, Находка и другие населенные пункты, предприятия судоремонтной, рыбообрабатывающей, энергетической, строительной, пищевой и легкой промышленности, от которых поступают сточные воды, содержащие многокомпонентные смеси загрязняющих веществ минерального и органического происхождения (Ващенко, 2000; Vl.ru). Показателем состояния исследуемых акваторий являются донные отложения, так как для них характерна способность накапливать различные вещества, в том числе и поллютанты. Вследствие осаждения веществ, попадающих в воду, донные отложения, по сравнению с поверхностными водами и толщей воды, являются средой с более богатым разнообразием субстратов, доступных для микроорганизмов (Walsh et al., 2016).

В настоящее время в литературе имеются ограниченные сведения о разнообразии микроорганизмов донных отложений прибрежных акваторий Приморского края. Для изучения сообществ микроорганизмов в основном используются только традиционные микробиологические методы, дающие представление лишь об ограниченном количестве бактерий, поддающихся культивированию. Бактерии филума Proteobacteria широко распространены в морской воде и являются весьма неоднородной группой, в них включены симбионты эукариот, большое число патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, фото- и хемотрофные виды бактерий, как авто-, так и гетеротрофы

(Garrity et al., 2005). Они являются одной из доминирующих групп практически во всех исследуемых микробиомах, служат основой всей экосистемы, играют важную роль в биогеохимическом круговороте веществ и энергии. Полное представление о составе бактериальных сообществ и, в частности, о разнообразии протеобактерий донных отложений может дать проведение метагеномного анализа.

В качестве районов исследования были выбраны 5 акваторий Приморского края с разной степенью антропогенной нагрузки. ДНК из образцов выделяли с помощью набора «НК-сорбент» комплектации «Base» (ЛИТЕХ, Россия). Полученные образцы отправляли в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). Регион V3-V4 гена 16S рРНК амплифицировали с помощью праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Контроль качества и редактирование прочтений проводили с использованием пакета R ShortRead (<https://bioconductor.org>). Обработку метагеномных данных проводили в программе Mothur v.1.40.5 (<https://www.mothur.org>). Полученные последовательности были идентифицированы с помощью сравнения с данными, зарегистрированными в базе SILVA (<https://www.arb-silva.de>). Статистические расчеты и построение графиков проводилось с помощью среды программирования R (<https://www.r-studio.com>) с использованием пакетов Vegan, ShortRead, gplots, ape.

Представители филума Proteobacteria доминировали во всех отобранных образцах, их доля в процентном соотношении составляла от 45,66 до 76,38%. Во всех акваториях преобладающими классами были Gammaproteobacteria (20,36–70,83%) и Alphaproteobacteria (4,51–18,69%). Класс Deltaproteobacteria был не менее распространен и присутствовал во всех образцах (1–18,8%). Gammaproteobacteria доминировали в б. Аякс (70,8%) и в б. Лукина (50,8%). Alphaproteobacteria преобладали в зал. Восток (18,7%), Deltaproteobacteria заняли существенную долю в б. Находка (16%) и прол. Старка (18,8%).

Проделанная работа позволила получить представление о таксономическом разнообразии бактерий изучаемых акваторий и, в частности, о составе филума Proteobacteria. В будущем эти данные могут быть применены для оценки влияния абиотических и антропогенных факторов на структуру сообществ микроорганизмов, для поиска потенциальных видов и новых генов с интересными свойствами для биотехнологического производства.

Список литературы:

1. Garrity, G. M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria / G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg // NY.: Springer, 2005. — 1388 p.
2. Walsh, E. A. Bacterial diversity and community composition from seafloor to subsurface / E. A. Walsh, J. B. Kirkpatrick, S. D. Rutherford, D. C. Smith, M. Sogin, S. D'Hondt // ISME J. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 979-989.

285 1Дальневосточный федеральный университет
Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

286 1Дальневосточный федеральный университет

287 1Дальневосточный федеральный университет

3. Vl.ru: Сайт Владивостока [Электронный ресурс] // ООО «Фарпост» — Режим доступа: <https://www.vl.ru>

4. Ващенко, М. А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия / М. А. Ващенко // Биол. моря. – 2000. – Т. 26, № 3. – С. 149–159.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОМОТОРОВ ГЕНА МЕТАНОЛОКСИДАЗЫ
ИЗ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA POLYMORPHA*
И *OGATAEA HAGLERORUM***

Д.А. Подплетнев²⁸⁸, А.Р Лаптева²⁸⁹, М.Г. Тарутина²⁹⁰

При помощи технологий рекомбинантных ДНК возможно получать широкий набор различных пептидов и белков, используя организмы и клетки, которые обычно их не производят. Ключевым моментом любой технологии получения рекомбинантного белка является выбор системы экспрессии, который зависит от свойств целевого белка и способности хозяйской клетки производить большое количество белка требуемого качества.

В настоящее время в качестве основы для разнообразных систем получения рекомбинантного белка широкую популярность обрели метилотрофные дрожжи *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Этот вид обладает преимуществами по сравнению с другими «шасси» для гетерогенной экспрессии [1]. Вид термоустойчивый и способен расти при температурах от 30 до 50 °С на простых питательных средах, используя в качестве источника углерода метанол или глицерин. Геном типовых штаммов этих дрожжей секвенирован, для них разработаны эффективные методы генетических манипуляций, в том числе системы CRISPR/CAS9 [2].

Метилотрофные дрожжи относятся к группе Кребтри-негативных микроорганизмов, не образующих этанол при аэробном росте. Это позволяет наращивать их до высокой плотности клеток в культуре, что повышает выход целевого белка. Кроме этого, для этих дрожжей не характерно появление иммуногенных структур при гликозилировании, что особенно важно при экспрессии терапевтических белков человеческого происхождения. Однако главной особенностью метилотрофных дрожжей является наличие сильных индуцибельных промоторов генов путей метаболизма метанола, применяемых при экспрессии чужеродных генов. К числу наиболее популярных относится промотор гена метанолоксидазы рМОХ. При росте на метаноле продукт этого гена может составлять до 40% внутриклеточного белка [3].

²⁸⁸ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²⁸⁹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²⁹⁰ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

В 2017 году было описан новый вид рода *Ogataea* – *O. haglerorum* [4]. Это близкородственный вид *O. polymorpha*, который представляет интерес для изучения в качестве перспективной базы для рекомбинантной экспрессии.

Нами была секвенирована последовательность промоторной области гена метанол оксидазы в *O. haglerorum*. Под контролем этого промотора и промотора полученного из *O. polymorpha* (pOhMOX и pOpMOX, соответственно) были изготовлены конструкции для рекомбинантной экспрессии репортерного гена – β-маннаназы. Культивирование штаммов, несущих данные конструкции, показало, что активность промотора pOhMOX приблизительно в 2 раза больше активности pOpMOX (1030 ед/мл манна-назой активности против 520 ед/мл). В тоже время нами была исследована активность промоторов напрямую подсчетом количества мРНК методом ПЦР в реальном времени. Полученные результаты указывают на усиление экспрессии под контролем pOhMOX приблизительно на треть по сравнению с pOpMOX.

Таким образом, промотор pOhMOX из недавно открытого вида *O. haglerorum* обладает повышенной активностью по сравнению с аналогичным промотором из *O. polymorpha*. Это обстоятельство позволяет рассматривать новый вид *O. haglerorum* в качестве перспективной базы для рекомбинантной экспрессии белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение №075-15-2019-1659 от 31.10.2019).

Список литературы:

1. Manfrão-Netto J. H. C., Gomes A. M. V., Parachin N. S. Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2019. – Т. 7. – С. 94.
2. Numamoto M., Maekawa H., Kaneko Y. Efficient genome editing by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* //Journal of bioscience and bioengineering. – 2017. – Т. 124. – №. 5. – С. 487-492.
3. Gödecke S. et al. Identification of sequences responsible for transcriptional regulation of the strongly expressed methanol oxidase-encoding gene in *Hansenula polymorpha* // Gene. – 1994. – Т. 139. – №. 1. – С. 35-42.
4. Naumov G. I., Naumova E. S., Lee C. F. *Ogataea haglerorum* sp. nov., a novel member of the species complex, *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2017. – Т. 67. – №. 7. – С. 2465-2469.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОДЗЕМНЫХ ВОД В РАЙОНЕ ШЛАМОХРАНИЛИЩА АО «ЧМЗ»

Н.М. Попова²⁹¹, А.В. Сафонов²⁹², А.В. Вишнякова²⁹³, Ю.В. Литти²⁹⁴

Комплексное загрязнение подземных вод азотистыми соединениями и ураном при эксплуатации поверхностных хранилищ твердых отходов предприятий добычи и переработки урановой руды может привести к серьезным нарушениям в подземных экосистемах, а также создает риски для здоровья при водозаборе. На данный момент многие хранилища, сооруженные в середине прошлого века и утратившие гидроизолирующие свойства, либо законсервированы, либо подлежат консервации в ближайшее время (например, бассейны на АО «Сибирский химический комбинат», АО «Чепецкий механический завод» (г. Глазов, Удмуртская Республика)). Наиболее перспективными для сдерживания и удаления загрязнений в подземных водах являются биогеохимические барьеры, формирующие локальную зону иммобилизации загрязнителей, создаваемые за счет активации аборигенной микробиоты дешевыми растворимыми донорами электронов. Высокая эффективность очистки подземных вод *in situ* происходит в условиях развития микробного сообщества в форме биопленок, создающих градиент концентраций загрязнителя, что защищает клетки от их токсического воздействия. Важно отметить, что в условиях развития биопленок могут протекать как анаэробные, так и аэробные процессы, необходимые для удаления окисленных и восстановленных форм азота. Кроме того, бактерии, осуществляющие анаммокс процесс, способные их использовать, обитают преимущественно в виде биопленок.

Объектом исследования в данной работе являются подземные водоносные горизонты в районе ОАО «Чепецкий механический завод» с экстремальным уровнем загрязнения нитратами, сульфатом и аммонием. В рамках данного исследования проведен сравнительный анализ микробных сообществ нескольких участков загрязненных подземных вод и выявлена корреляция их таксономического состава относительно концентрации основных загрязнителей. В большинстве проб обнаружены представители семейств *Pseudomonadaceae* и *Comamonadaceae*, способных к восстановлению нитратов,

²⁹¹ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4.

²⁹² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4.

²⁹³ Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312, Россия, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

²⁹⁴ Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312, Россия, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

сульфатов, железа и урана (рис. 1, 2), а также анаммокс-бактерий семейств *Scalinduaceae* и *Brocadiaceae*, способных обитать при температуре 8-10°C. Дальнейшее изучение этих организмов интересно как с точки зрения их использования в *in situ* биогеохимическом барьере, так и с точки зрения выделения перспективных психрофильных культур для использования в промышленной водоочистке.

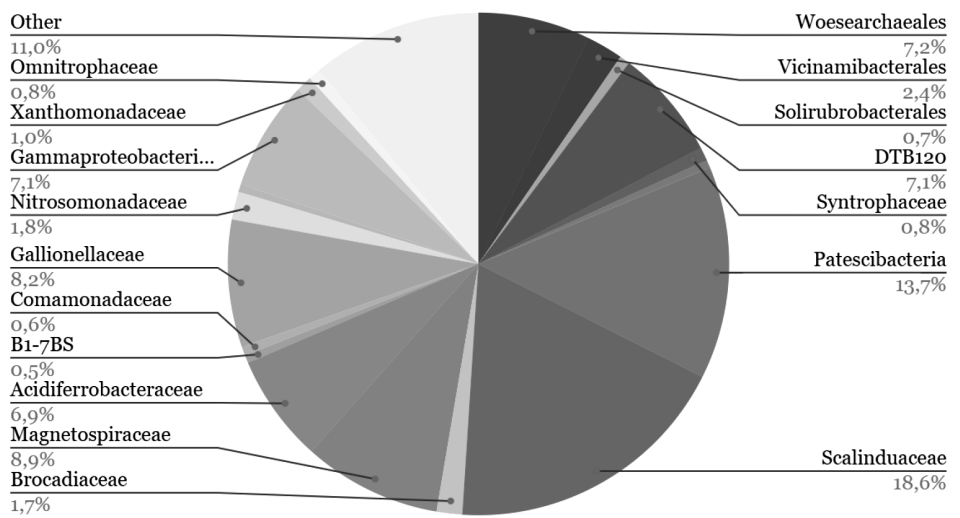


Рис. 1 Состав микробного сообщества скважины р6 с сульфатным, нитратным и аммонийным загрязнением на территории ОАО «ЧМЗ»

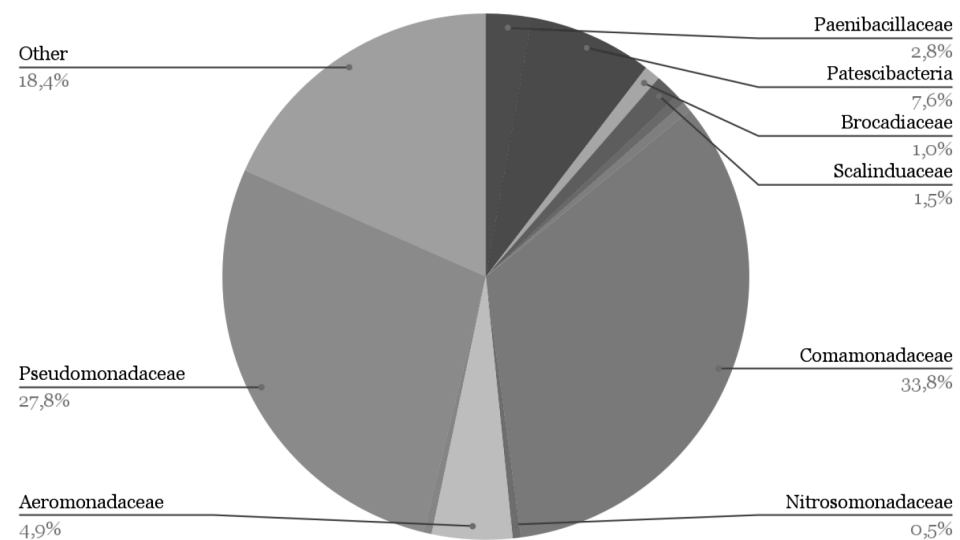


Рис. 2 Состав микробного сообщества скважины H7 с загрязнением ураном и окисленными соединениями серы на территории ОАО «ЧМЗ»

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00701, <https://rscf.ru/project/22-24-00701/>.

МЕТОД ФАЗИРОВАНИЯ ОСНОВАННЫЙ НА КОМПЛЕКСЕ ХЕЛАТИРУЕМОГО Gd

В.А. Поспелов²⁹⁵, В.И. Борщевский²⁹⁶

Белки являются незаменимой частью любого живого организма, выполняя широкий спектр различных функций. Важнейшим классом являются мембранные белки, выполняющие транспортную, рецепторную и сигнальную функции. При этом среди около 200,000 структур в RSCB PDB лишь около 2% относятся к мембранным белкам. Существенный вклад в получение их структуры вносят источники синхротронного излучения, генерирующие чрезвычайно яркое, узконаправленное и имеющее квазинепрерывный спектр рентгеновское излучение. Более 85% структур всех исследованных белков получены методами рентгеновской дифракции.

Однако, в рентгеновской дифракции существуют проблема потери фазы. Фаза несет в себе существенную часть информации о структуре. Важнейшими методами определения фаз являются одно- и много-волновая аномальная дифракция (SAD / MAD, соответственно), широко применяющиеся последние двадцать лет и использующие возможность выбора нужной длины волны рентгеновского излучения и свойства аномальных поправок атомарного фактора рассеяния излучателей

Одним из таких перспективных излучателей является Gd, имеющий один из самых больших аномальных сигналов среди аналогов¹. Показано², что производные кристаллы белка с комплексами Gd достаточно просто получить, при этом комплексы не изменяют условия кристаллизации исходного белка даже при высоких концентрациях. Кроме того, предварительно выращенные кристаллы белка хорошо переносят вымачивание в растворах хелатированного гадолиния. Использование различных хелатирующих агентов меняет характер связывания.

В рамках данной работы произведена проверка нового метода фазирования, основанного на комплексах Gd, для изучения мембранных белков. В качестве объектов исследования были выбраны, закристаллизованы и изучены представители класса ретинальных белков и рецептор, сопряженный с g-белком.

Список литературы:

1. Stelter M. et al. A complement to the modern crystallographer's toolbox: caged gadolinium complexes with versatile binding modes //Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2014. – Т. 70. – №. 6. – С. 1506–1516.

²⁹⁵ Московский Физико-Технический Институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

²⁹⁶ Московский Физико-Технический Институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

2. Girard É. et al. Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2002. – Т. 58. – №. 1. – С. 1–9.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МЕТАНОГЕННЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ СИСТЕМ АНАЭРОБНОЙ ОБРАБОТКИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

В.В. Потокина²⁹⁷, Ю.В. Литти²⁹⁸, С.Н. Паршина²⁹⁹

В анаэробной обработке различных органических отходов принимают участие множество видов бактерий и архей. Исследование биоразнообразия анаэробных микробных сообществ, в том числе выделение и изучение отдельных видов, представляет большой интерес как для фундаментальной науки, так и имеет прикладное значение для развития экобиотехнологии с применением наиболее интересных и перспективных видов и штаммов микроорганизмов, например для очистки сточных вод и переработки различных органических отходов.

В данном исследовании с целью обнаружения новых анаэробных микроорганизмов мы работали с накопительными культурами, полученными нами ранее из различных анаэробных систем обработки органических отходов.

Путем анализа состава микробного сообщества по V3-V4 региону 16S рРНК в синтрофных накопительных культурах, полученных нами из метаногенных консорциумов осадка термофильного метантенка, были детектированы микроорганизмы, относящиеся к новым, ранее неизученным таксонам, и представляющие интерес для дальнейшей работы с ними.

Из жидких стоков низкотемпературного навозохранилища свинофермы была выделена в чистую культуру бактерия, на 99,7% близкая к виду *Desulfovibrio desulfuricans*, вероятно представляющая собой новый штамм этого вида. При выделении культуры источником углерода служила сахароза, а сульфат использован не был. Бактерии этого рода известны своей устойчивостью к тяжелым металлам и поэтому используются в биотехнологии очистки сточных вод.

Таксономический состав накопительной культуры, полученной из гранулированной биомассы низкотемпературного метаногенного EGSB-реактора был проанализирован

²⁹⁷ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

²⁹⁸ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

²⁹⁹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

по V3-V4 региону 16S рРНК. Анализ показал, что в упомянутой накопительной культуре присутствуют бактерии, близкие на 98,87% к виду *Brevundimonas bullata* и на 95,2% к виду *Pseudorhodoplanes sinuspersici*. Примечательно, что бактерии рода *Brevundimonas* являются аэробами, а *Pseudorhodoplanes* – факультативными аэробами, в то время в нашей работе все культуры выращивали в анаэробных условиях. В дальнейшем будет продолжено выделение этих изолятов в чистые культуры.

Из той же накопительной культуры была выделена в чистую культуру бактерия, по результатам анализа последовательностей гена 16S рРНК в равной степени близкая к трем видам бактерий разных родов: *Fermentimonas caenicola* (96,27%), *Proteiniphilum acetatigenes* (96,13%), *Lascolabacillus massiliensis* (96,24%). Для уточнения таксономического положения бактерии будет секвенирован и проанализирован ее геном и, при подтверждении новизны изолята, проведено описание.

Таким образом, в результате проведенного исследования были получены новые данные о биоразнообразии микроорганизмов различных систем анаэробной обработки органических отходов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

СВЯЗЬ МЕЖДУ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЛИЗОЦИМА И СОРБЦИЕЙ ФЕРМЕНТА НА ЖИВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ В ПРИСУТСТВИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОРОВ

Н.В. Растрига³⁰⁰, Д.А. Гасанова³⁰¹, С.А. Смирнов³⁰², П.А. Левашов³⁰³

Во всём мире фермент лизоцим все чаще рассматривается в качестве альтернативы антибиотикам в борьбе с резистентными бактериями и находит широкое применение в биотехнологии. Так, например, лизоцим используется в сельском хозяйстве в качестве натурального консерванта в кормах. Увеличение бактериолитической активности лизоцима осуществляется, в частности, посредством добавления низкомолекулярных веществ – эффекторов. Недавно было обнаружено, что антибактериальная активность лизоцима в отношении грамотрицательных бактерий значительно усиливается в присутствии глицина и заряженных аминокислот [1], однако молекулярная причина этого эффекта остается неясной. В данной работе мы исследуем физико-химические параметры сорбции лизоцима на живых клетках в присутствии глицина и заряженных аминокислот. Выявлена связь между изменением термодинамических параметров сорбции фермента на бактериальных клетках *Escherichia coli* и повышением бактериолитической активности лизоцима. В качестве добавок (эффекторов) использовали аминокислоты глицин, глутамат, аспартат, лизин, гистидин и аргинин. Увеличение скорости лизиса бактерий в присутствии добавок составило от 1,4 до 1,9 раза. При этом константа десорбции лизоцима на бактериальных клетках в присутствии добавок снижалась в 1,4–1,7 раза, что свидетельствует о более прочном связывании фермента в присутствии эффектора. Наибольшие эффекты наблюдались для глицина и аргинина. Понимание молекулярной природы усиления антибактериального действия лизоцима в присутствии добавок может помочь в разработке новых высокоэффективных антибактериальных препаратов, гигиенических и антисептических средств, а также консервантов.

³⁰⁰ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³⁰¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³⁰² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³⁰³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

Список литературы:

1. Levashov, P.A., Matolygina, D.A., Ovchinnikova, E.D., Adamova, I.Y., Gasanova, D.A., Smirnov, S.A., Nelyub, V.A., Belogurova, N.G., Tishkov, V.I., Ereemeev, N.L., Levashov, A.V. (2019) The bacteriolytic activity of native and covalently immobilized lysozyme against Gram-positive and Gramnegative bacteria is differentially affected by charged amino acids and glycine, FEBS Open Bio, 9 (3), 510.

**НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ И ПОЛНОТА ДАННЫХ
МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ
МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ**

Ю. Л. Рижиков³⁰⁴, А.В. Власов³⁰⁵, В.И. Горделий³⁰⁶, А.И. Куклин³⁰⁷

Мембранные белки (МБ) играют жизненно важную роль в функционировании клеток [1], а также являются основными мишенями для лекарственных средств [2]. Структурная информация о белках жизненно важна для понимания механизма их функционирования и имеет решающее значение для разработки лекарств. Однако получение структур мембранных белков с высоким разрешением (в частности, в нативных условиях) по-прежнему остается большой проблемой. Уникальные структуры МБ составляют всего 1% от общего количества полученных в литературе уникальных белковых структур [3], [4].

В тех случаях, когда для мембранного белка не удаётся получить структуру высокого разрешения с помощью стандартных – методов рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии одиночных частиц, ценную структурную информацию могут предоставить методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов с низким разрешением (МУРР и МУРН). Однако в некоторых случаях малоугловое рассеяние (МУР) дает неоднозначную структурную информацию *ab initio*, если не выполняются дополнительные измерения и/или не принимается во внимание априорная информация о белке [5], [6]. Понимание природы ограничений может помочь преодолеть эти проблемы. Одной из основных проблем анализа данных малоуглового рассеяния для солюбилизированных мембранных белков является вклад детергентного пояса, окружающего МБ. В настоящей работе был проведен всесторонний анализ того, как детергентный пояс вносит вклад в данные МУР мембранно-белкового комплекса сенсорного родопсина II с его родственным трансдюсером из *Natronomonas pharaonis* (*NpSRII-NpHtrII*). Влияние полидисперсности олигомеризации *NpSRII-NpHtrII* явля-

³⁰⁴ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия
E-mail: rzhokov@phystech.edu

³⁰⁵ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия

³⁰⁶ Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Гренобль, Франция

³⁰⁷ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Объединённый Институт Ядерных Исследований, Дубна, Россия

ется второй проблемой, которая рассматривается в настоящей работе. Показано, что неоднородность плотности длины рассеяния детергентного пояса, окружающего мембранную часть комплекса, и полидисперсность олигомеризации существенно влияют на профили МУРР и МУРН и, следовательно, на трехмерные *ab initio* структуры. Описано, как можно учесть обе проблемы для повышения качества обработки данных МУР. Поскольку данные МУР для МБ обычно получают по солюбилизированным белкам, а их детергентный пояс и, в определенной степени, полидисперсность олигомеризации – достаточно распространенные явления, подходы, предложенные в настоящей работе, могут быть использованы при исследовании МУР различных МБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 20-54-12027).

Список литературы:

- [1] G. Von Heijne, “The membrane protein universe: What’s out there and why bother?” *Journal of Internal Medicine*, vol. 261, no. 6. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 543–557, Jun. 01, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01792.x.
- [2] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins, “How many drug targets are there?” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 12, pp. 993–996, Dec. 2006, doi: 10.1038/nrd2199.
- [3] MPSTRUC, “Membrane Proteins of Known 3D Structure,” <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>.
- [4] PDB Statistics, “Number of Unique Protein Sequence Clusters within Released PDB Structures (Annual) at identity 95%,” <https://www.rcsb.org/stats/sequence/cluster-ids-95>.
- [5] Y. L. Ryzhykau *et al.*, “Ambiguities in and completeness of SAS data analysis of membrane proteins: the case of the sensory rhodopsin II–transducer complex,” *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, vol. 77, no. 11, pp. 1386–1400, Oct. 2021, doi: 10.1107/s2059798321009542.
- [6] Y. L. Ryzhykau *et al.*, “Molecular model of a sensor of two-component signaling system,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 10774, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-89613-6.

МОДИФИКАЦИЯ СИСТЕМ ТРАНСПОРТА L-ВАЛИНА У *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ДАННОЙ АМИНОКИСЛОТЫ

В.В. Розанцева³⁰⁸, К.Э. Ануфриев³⁰⁹, М.Е. Шереметьева³¹⁰,
Л.Е. Рябченко³¹¹, Т.Е. Леонова³¹², Т.И. Калинина³¹³, А.С. Яненко³¹⁴

L-валин (далее – валин) относится к незаменимым аминокислотам, то есть таким, которые не синтезируются в организме человека и животных и должны поступать с пищей. Валин широко применяется как кормовая добавка, поскольку обогащение им кормов положительно сказывается на качестве и количестве мяса свиней и цыплят-бройлеров. В настоящее время в связи с интенсификацией животноводства спрос на валин повсюду в мире постоянно растет. Однако весь валин, потребляемый в Российской Федерации, импортируется из Китая, на территории РФ его производство отсутствует. Создание такого производства является важным для развития сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности нашей страны.

Ведущий способ получения аминокислот – биотехнологический синтез, в основе которого – переработка доступных возобновляемых субстратов в целевой продукт при помощи микроорганизмов-продуцентов. Такие микроорганизмы должны обладать рядом свойств, среди которых безопасность для человека и животных, отсутствие образования эндотоксинов, стрессоустойчивость, пластичный метаболизм и способность расти на широком круге субстратов. Всеми этими характеристиками обладает актинобактерия *Corynebacterium glutamicum*, что обусловило ее широкое использование в качестве основы для создания продуцентов аминокислот.

Ведущий подход к созданию штаммов-продуцентов – рациональная метаболическая инженерия, то есть направленное изменение метаболических путей посредством модификации генов-мишеней с известными функциями. Такими мишенями в большинстве случаев являются гены ферментов, катализирующих реакции биосинтеза целевого продукта,

³⁰⁸ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³⁰⁹ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³¹⁰ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³¹¹ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³¹² НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³¹³ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

³¹⁴ НИЦ «Курчатовский институт» – Геномный центр «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии»

участвующих в метаболизме предшественников и кофакторов и в образовании побочных продуктов, а также гены, ответственные за экспорт и импорт целевого продукта.

Представленное исследование посвящено направленной модификации *C. glutamicum* для повышения продукции валина. Биосинтез валина у коринебактерий хорошо изучен с точки зрения генетики, биохимии и регуляции процесса [1]. Существует большое количество публикаций, в которых показано, что модификация генов, прямо или косвенно связанных с биосинтезом валина, приводит к повышению его продукции. Транспорт валина также изучен достаточно подробно, но воздействию на транспортные системы в опубликованных работах уделяется значительно меньше внимания. Цель нашего исследования – заполнить этот пробел, показав влияние на продукцию валина у коринебактерий модификации генов, кодирующих экспортер и импортер валина.

За экспорт и импорт валина у *C. glutamicum* отвечают пермеазы BrnFE и BrnQ, соответственно. Экспортер состоит из двух белков, кодируемых генами *brnF* и *brnE*, расположенными в одном опероне. Выше оперона, дивергентно по отношению к нему, расположен ген *lpr*, кодирующий фактор регуляции транскрипции *brnFE*. При высокой концентрации валина в клетке он взаимодействует с белком Lpr и изменяет его конформацию, что приводит к связыванию Lpr с промотором *brnFE*, усилению транскрипции оперона, и, как результат, к появлению в клетке большего количества белков экспортера. Импортер представляет собой один белок, кодируемый геном *brnQ*, расположенным независимо от *brnFE*.

Объектом данного исследования стал штамм дикого типа – *C. glutamicum* ATCC 13869, изначально неспособный продуцировать валин. Данный штамм был подвергнут ряду модификаций, благодаря которым такая способность у него появилась. Продукция валина составила 18–20 г/л за 48 часов ферментации в пробирках. Замена нативного промотора перед опероном *brnFE* на искусственный промотор P7 [2] привела к усилению уровня экспрессии генов оперона более чем в 10 раз и к дальнейшему повышению продуктивности, которая достигла 24–26 г/л валина. Полученные данные позволили заключить, что усиление транскрипции оперона *brnFE* может быть полезным при создании штамма – продуцента валина. Результаты проверки того, как подобные модификации влияют на продукцию валина у других штаммов, будут представлены. Также будут представлены результаты проверки того, как влияет на продукцию валина инактивация импортера BrnQ.

Список литературы:

1. Liu J., Xu J.Z., Wang B. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects. *Amino Acids*, 2021, 53(9), 1301-1312. doi: 10.1007/s00726-021-03066-9
2. Tan S., Shi F., Liu H., et al. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by modified L-isoleucine biosensor in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth. Biol.*, 2020, 9, 9, 2378-2389. doi 10.1021/acssynbio.0c00127

БИОХИМИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

М.В. Романова³¹⁵, С.А. Евдокимова³¹⁶, Н.Ю. Хромова³¹⁷, А.В. Белодед³¹⁸

В настоящее время большое внимание привлекают биоразлагаемые материалы и технологии, использующие возобновляемые сырьевые ресурсы и отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности. Такие материалы и технологии их производства получают все больше конкурентных преимуществ ввиду растущей стоимости нефтехимических ресурсов, а главное – экологических проблем, возникающих из-за больших объемов производства и повсеместного применения синтетических небиodeградируемых полимеров. В связи с этим можно спрогнозировать постепенное замещение неразлагающихся полимеров их биodeградируемыми аналогами в изделиях бытового назначения, одноразовых, упаковочных и других материалах. Одним из перспективных материалов является биоразлагаемый пластик полилактид, мономером которого является молочная кислота. Полилактид имеет широкий спектр применения: от медицинских изделий (импланты, хирургические швы, устройства для фиксации костей) и материала для 3D-принтеров до упаковочной пленки и одноразовой посуды [1]. Свойства полилактида определяются соотношением L- и D-изомеров лактата в цепи, поэтому при производстве биопластика важнейшей задачей является получение оптически чистой молочной кислоты. Микробиологический синтез лактата имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным химическим синтезом, в их числе – экологичность, возможность получать оптически чистые изомеры, а также возможность использовать возобновляемые и доступные субстраты, например, отходы пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности [2]. При выборе продуцента перспективным может быть использование термофильных и термотолерантных культур, поскольку ведение процесса при повышенных температурах позволяет снизить риск контаминации, увеличить растворимость субстрата и скорость его конверсии. Среди бактерий известны термофильные штаммы, осуществляющие молочнокислородное брожение, например, некоторые представители рода *Bacillus* (в частности *B. coagulans*), которые дополнительно имеют ряд преимуществ, а именно используют ши-

³¹⁵ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³¹⁶ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³¹⁷ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³¹⁸ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

рокий спектр субстратов, малотребовательны к наличию в среде факторов роста и т.д. [3]. Таким образом, актуальной задачей является поиск высокопродуктивных бактериальных продуцентов, способных синтезировать определенный изомер молочной кислоты с использованием различного сырья. Целью настоящей работы являлся скрининг термофильных штаммов на образование ими органических кислот, в частности лактата, и подтверждение наличия гена, кодирующего L-лактатдегидрогеназу – фермента, ответственного за синтез L-изомера молочной кислоты.

В качестве объекта исследования использовали термофильные бактериальные штаммы, выделенные ранее из образцов природного происхождения при 50°C [4]. Методом ВЭЖХ культуры были проанализированы на способность продуцировать молочную, уксусную и пропионовую кислоты при различных условиях аэрации (рис. 1). Также определялись секретируемые ферменты различных типов. По результатам экспериментов было отобрано два перспективных штамма-продуцента, способных синтезировать молочную кислоту в значимых количествах с минимальной концентрацией побочных органических кислот на средах с углеводным субстратом [4]. Культивирование в лабораторном ферментере в анаэробных условиях при рН-статировании и внесении подпиток показало высокую продуктивность процесса.

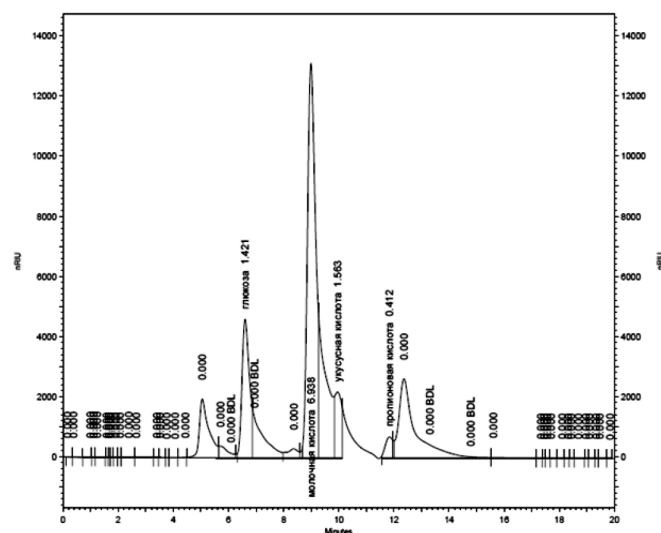


Рис. 1. Хроматограмма культуральной жидкости термофильного штамма Кб.15.Г.41 – потенциального продуцента молочной кислоты

У ряда исследуемых культур была выявлена амилалитическая и целлюлазная активности. По совокупности физиологических и биохимических характеристик выделенные термофильные штаммы были предварительно отнесены к *p. Bacillus*. Для проведения ПЦР-скрининга культур на наличие генов, кодирующих L-лактатдегидрогеназу, были сконструированы вырожденные праймеры к соответствующим последовательностям, характерным для видов *B. coagulans* и *B. subtilis*: 5'-CGGSCTGCCGAAAGAAC-3' (прямой праймер) и 5'-GCCGTGYTCGCCGATAAT-3' (обратный праймер). Результаты

генетических исследований показали наличие у обоих штаммов бациллярного гена, ответственного за образование L-лактата (рис. 2).

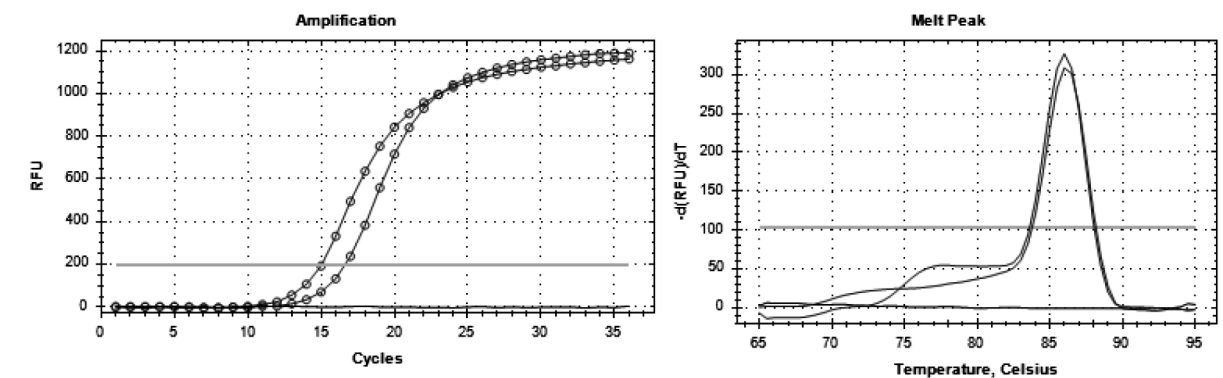


Рис. 2. Кривые амплификации и плавления продукта ПЦР в реальном времени для термофильных штаммов Кб.13.Гл.24 и Кб.15.Г.41.

Полученные данные биохимического и генетического скрининга позволяют рассматривать данные термофильные штаммы в качестве потенциальных промышленных продуцентов молочной кислоты. Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию состава питательной среды и подбор доступных субстратов, интенсификацию процесса биосинтеза L-лактата с помощью различных инженерно-технологических приемов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РХТУ им. Д.И. Менделеева, прикладной научно-исследовательский проект молодых штатных работников РХТУ им. Д.И. Менделеева в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» № ВИГ-2022-040.

Список литературы:

1. Svetlitchnyi V.A., Svetlichnaya T.P., Falkenhan D.A. et al. Direct conversion of cellulose to L-lactic acid by a novel thermophilic *Caldicellulosiruptor* strain // *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 2022. – Vol.15. – No.1 (44). – P. 1–12.
2. Zhang F., Liu J., Han X. et al. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LtRFb) l-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain // *Engineering in life sciences*, 2020. – Vol.20. – No.12. P. 562–570.
3. Coelho L.F., Beitel S.M., Sass D.C. et al. High-titer and productivity of l-(+)-lactic acid using exponential fed-batch fermentation with *Bacillus coagulans* arr4, a new thermotolerant bacterial strain // *3 Biotech*, 2018. – Vol.8. – No.4 (213). – P. 1–8.
4. Романова М.В., Галеева Ю.С., Шустов М.Д., Белодед А.В. Биотехнологический потенциал умеренных термофильных бактерий как продуцентов первичных метаболитов и ферментов // Сборник материалов конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 2019. – Т.1. – Москва: ООО «РЭД ГРУПП», 2019. – С. 508–510.

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ПСИХРОФИЛЬНЫМИ И УСЛОВНО- ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Д.А. Русакова³¹⁹, М.Л. Сидоренко³²⁰

Микроорганизмы в почве образуют сложный биоценоз, в котором различные группы находятся в определенных соотношениях, меняющихся в зависимости от изменения почвенных условий. Присутствие микроорганизмов в той или иной природной зоне определяется не только условиями внешней среды, но и наличием контроля со стороны других микроорганизмов. В литературе имеются сообщения об антагонистическом действии бактерий и актиномицетов, проявляющих психрофильные свойства, на фитопатогенные грибы и бактерии [1-3]. Почва служит благоприятной средой не только для сапрофитных микроорганизмов, но и для развития патогенных бактерий [4]. В нашем исследовании мы изучали антагонистическую активность почвенных психротрофных микроорганизмов по отношению к условно - патогенным бактериям.

В работе использовали 20 штаммов почвенных психротрофных бактерий (ППБ) из коллекции ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН и 7 штаммов условно-патогенных бактерий (УПБ) (*Y. pseudotuberculosis* 512, *Y. pseudotuberculosis* 3260, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes* 310, *L. monocytogenes* 315, *S. enterica* 118, *S. typhimurium* 24585) из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. Антагонистическую активность проверяли модифицированным методом капель Н.А. Глушановой [5] инкубируя культуры при 22 °С. Предварительный учет результатов проводили через 20 ч. инкубации, окончательный учет – через 48 ч. Результат опыта учитывали визуально по наличию признаков подавления одной культуры другой.

В результате исследований антагонистическая активность ППБ в отношении УПБ не обнаружена. В свою очередь УПБ проявляли ингибирующие свойства на рост исследуемых ППБ в период культивирования. Штамм *S. enterica* 118 оказал наибольшее негативное влияние на рост исследуемых ППБ, на его фоне ингибирование роста отмечено у 14 штаммов ППБ. *L. monocytogenes* 315 9852 В-6144/1 совсем не оказал ингибирующих свойств в отношении исследуемых ППБ, на его фоне выросло 20 штаммов из 20. Самыми устойчивыми оказались ППБ штаммов 1SN 3-3, 1SN 3-2 и 6SKS 3-3, они росли во всех вариантах культивирования с УПБ. Нуклеотидная последовательность этих

трех штаммов показала принадлежность к роду *Pseudomonas*, ранее выделенные из листового перегноя в Польше и из почвы горной местности Китая, соответственно. Наиболее активно подавляется рост штамма ППБ М1-3, нуклеотидная последовательность которого показала высокий процент гомологии (99,52%) с *Arthrobacter* sp. PF3B2 (KC311588), обнаруженным в многолетнемерзлой почве Западного Шпицбергена.

Таким образом, исследуемые штаммы ППБ не проявили антагонистической активности по отношению к УПБ, в большинстве своем оказались способными к совместному культивированию. В отдельных случаях отмечено подавление роста психротрофных микроорганизмов условно-патогенными бактериями.

Список литературы:

1. Гуревич П.А. Антагонистическая активность некоторых штаммов рода *Bacillus* против фитопатогенных микромицетов / Вестник Казанского технологического университета. 2012. Том 15, № 11. С. 137–139.
2. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Семенов С.Ю. Антагонистическое действие на фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост и развитие растений формальдегидутилизирующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 / Вестник томского государственного университета. Биология. 2008. Том 2, № 3. С. 28–42.
3. Широких И.Г. Широких А.А. Ашихмина Т.Я. Оценка антагонистического потенциала и антибиотической устойчивости актиномицетов, выделенных из двух желтоземов юго-восточного Китая. Почвоведение. 2018. № 7. С. 859–867.
4. Бузолева Л.С. Сапрозоонозы: вчера, сегодня, завтра Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2011. Том 31. № 4. С. 64–71.
5. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.П., Соколова К.Я. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* / Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. Том 2, №2. С. 462–468.

³¹⁹ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия

³²⁰ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия

«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, Владивосток, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ МИКРОФЛОРЫ СОДЕРЖИМОГО ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ-ГЕОФАГОВ, ОБИТАЮЩИХ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Ю.Ю. Рысева³²¹, Е.Г. Лебедева³²², А.М. Паничев³²³

Намеренное потребление грунтов в пищу (или геофагия) – феномен, который широко распространен среди травоядных и всеядных животных, обитающих в различных горных регионах мира [1; 2]. Однако, однозначных и универсальных причин геофагии все еще не установлено, а биологическое действие поедаемых грунтов на организм может быть многогранно [3; 4]. Основываясь на том, что микроорганизмы обладают широкими физиологическими возможностями, мы предполагаем, что, заносясь вместе с поедаемыми горными породами, микроорганизмы могут снабжать организм животного питательными веществами, улучшать пищеварение, способствовать защите от различных заболеваний, а также, возможно, участвовать в накоплении и переводе минеральных компонентов в доступную для животных форму. В связи с этим, целью данного исследования было изучить численность различных физиологических групп, таксономический состав и некоторые эколого-физиологические особенности микроорганизмов, изолированных из содержимого пищеварительного тракта животных-геофагов.

Для проведения исследований в сентябре 2020 года были отобраны образцы содержимого рубца и толстого кишечника животных, обитающих на территории национальных парков «Бикин» и «Зов Тигра» в Приморском крае. В качестве исследуемых животных были выбраны кабарга (*Moschus moschiferus*) и изюбрь (*Cervus elaphus xanthopygus*), для которых характерна геофагия (Середкин, 2016). Пробы отбирали сразу же после убоя в максимально стерильных условиях, после чего содержимое внутренних органов помещали в анаэробные контейнеры. Пробы до анализа хранили не более 12 часов в холодильнике при 4°C. Для определения численности и физиологических свойств микроорганизмов использовались классические методы практической микробиологии, идентификация изолятов проводилась с применением молекулярно-генетических методик.

³²¹ Кафедра биоразнообразия и морских биоресурсов ИМО ДВФУ

³²² ФГБУН «Дальневосточный геологический институт ДВО РАН»

³²³ ФГБУН «Тихоокеанский институт географии ДВО РАН»

Общая сапрофитных микроорганизмов в содержимом рубца и толстого кишечника варьировалась от $1,4 \times 10^5$ до $4,7 \times 10^8$ КОЕ/г. Наиболее высоких значений достигала численность микроорганизмов-деструкторов глюкозы ($2,5 \times 10^5$ - $4,5 \times 10^9$ КОЕ/г), крахмала ($1,1 \times 10^5$ - 2×10^7 КОЕ/г), желатины ($3,2 \times 10^3$ - $2,9 \times 10^7$ КОЕ/г), пектина ($7,9 \times 10^4$ - $8,1 \times 10^5$ КОЕ/г) и целлюлозы ($0-9,5 \times 10^4$ кл/гр). Во всех образцах содержимого рубца было обнаружено высокое содержание силикатных бактерий ($3,0 \times 10^5$ - $5,0 \times 10^6$) и дрожжей ($7,0 \times 10^4$ - $3,5 \times 10^6$) в то время как в толстом кишечнике данные микроорганизмы отсутствовали. Высокие значения численности силикатных бактерий и дрожжей также были характерны и для грунтов, поедаемых животными в тех же районах, исследованных нами ранее. Среди изолятов из содержимого пищеварительного тракта животных преобладали почвенные и эндофитные бактерии. Наиболее распространенными родами бактерий являлись *Stenotrophomonas*, *Brucella*, *Brevibacterium*, *Serratia* и *Bacillus*. Кроме того, было отмечено высокое разнообразие спорообразующих бактерий родственных *Bacillus*: представителей таких родов как *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Alkalihalobacillus*, *Virdibacillus*, *Solibacillus*, *Lysinibacillus*, *Neobacillus*, *Peribacillus*, *Mesobacillus* и *Cytobacillus*. Выделенные из рубца дрожжи были представлены одним видом – *Rhodotorula mucilaginosa*, широкое присутствие которого было также отмечено нами и в поедаемом животными грунте.

Исследование выделенных штаммов на способность утилизировать сахара показало, высокую активность ферментации простых сахаров, в особенности ксилитозы, которая утилизировалась 73% исследуемых штаммов в анаэробных условиях. Для всех культур был характерен высокий уровень уреазной (66,7%), пектиназной (76,7%), амилазной (50,0%), желатиназной (70,0%), казеиназной (50,0%) и лецитиназной (63,3%) активностей. При этом, занимательно, что при сравнении ферментативной активности штаммов бактерий, выделенных из грунтов и штаммов, выделенных из пищеварительного тракта и при этом относящихся к одному биологическому виду, наблюдаются различия в наличии лецитиназной и казеиназной активностей (таблица 1), что может косвенно указывать на наличие у бактерий адаптаций к существованию внутри организма животного.

Кроме того, проводилось изучение активности роста выделенных культур при различных параметрах среды. Результаты показали, что температурный оптимум для большей части изолятов лежит в районе 25-35°C, при этом 53,3% культур были способны расти при 42°C, а 26% – при 50°C. Кроме того, большая часть выделенных из внутренних органов штаммов микроорганизмов была толерантна к изменениям кислотности среды и проявляла способность к росту при pH от 5,0 до 12,0

Таким образом, данная работа показывает преобладание микроорганизмов-деструкторов органических веществ, а также силикатных бактерии, которые могут способствовать процессам преобразования соединений кремния и высвобождению других элементов в пищеварительном тракте животных. Также полученные результаты обращают внимание на некоторые особенности микроорганизмов, выделенных из внутренних органов и, возможно, указывают на адаптации, позволяющие им функционировать в условиях желудочно-кишечного тракта.

Таблица 1.

Сравнение ферментативной активности микроорганизмов, относящихся к одному виду, но выделенных из разных источников

	Разлагаемый субстрат								CYP	CAT
	Казеин	Желатин	Крахмал	Липиды	Лецитин	Целлюл.	Пектин	Мочевин.		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>										
Грунт	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
РК	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>										
Грунт	-	++	+	+	-	-	+	+	-	-
РИ	-	++	-	+	++	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus yunnanensis</i>										
Грунт	-	++	+	+	-	+	+	+	-	+
РИ	-	++	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Delftia acidovorans</i>										
Грунт	-	++	+	-	-	+	+	+	+	+
РИ	++	++	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>										
Грунт	-	++	-	+	+	+	-	-	-	+
РК	++	++	-	-	+	-	+	+	-	+
ТКИ	+	++	-	-	+	-	+	+	-	+

Примечание: РК – рубец кабарги; РИ – рубец изюбря; ТКИ – толстая кишка изюбря. (-) – отсутствие активности; (+) – слабая активность; (++) – выраженная активность

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №20-67-4700578

Список литературы:

1. Mahaney W. C. Understanding Geophagy in Animals: Standard Procedures for Sampling Soils / W. C. Mahaney, R. Krishnamani // J Chem Ecol. – 2003. – № 29. – P. 1503–1523.

2. Паничев, А. М. Литофагия: причины феномена / А. М. Паничев // Природа. – 2016. – № 4. – С. 25-34.

3. Abrahams, P. W. Geophagy and the Involuntary Ingestion of Soil. In: Selinus, O. (eds) Essentials of Medical Geology / P. W. Abrahams // Springer, Dordrecht. – 2013. – P. 433-454.

4. Panichev A. M. Geophagy in animals and geology of kudurs (mineral licks): a review of Russian publications / A. M. Panichev [et al.] // Environ Geochem Health. – 2013. – № 35. – P. 133-152.

ПЕЩЕРЫ – ИСТОЧНИК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ (НА ПРИМЕРЕ ПЕЩЕРЫ КИНДЕРЛИНСКАЯ)

А.С. Рябова³²⁴, Л.Ю. Кузьмина³²⁵, Е.А. Гильванова³²⁶, Н.Ф. Галимзянова³²⁷, Т.Н. Архипова³²⁸

Пещеры являются экстремальными экосистемами, в которых при отсутствии света, низких температурах, постоянной, как правило, высокой влажности и низком содержании органических веществ, формируются специфические сообщества микроорганизмов, адаптированные к подобным условиям. Микроорганизмы подземных полостей устойчивы к низким температурам, что значительно продлевает период их активности в естественных условиях умеренных и северных широт, снижает затраты при культивировании и делает крайне привлекательными для применения в биотехнологических целях (Хижняк и др., 2012, Ghosh et al., 2016, Maciejewska et al., 2016).

Особенно значимо на сегодняшний день стоит вопрос о применении микроорганизмов в сельском хозяйстве в качестве средств повышения урожайности растений. Замена химических препаратов и удобрений на микробные препараты, положительно влияющие на продуктивность растений, является основным направлением экологически безопасного развития сельскохозяйственной деятельности.

Цель данной работы – анализ влияния на растения новых штаммов бактерий, выделенных из пещеры Киндерлинская.

Материалы и методы. Пещера Киндерлинская (30-летия Победы) расположена в южной части хребта Улутау (Южный Урал). Сама пещера залегает в известняках верхнего девона (D3fm) и представляет собой наклонно-горизонтальную систему галерей и ходов (Смирнов, Соколов, 2002). Исследованные штаммы микроорганизмов были выделены из грунта зала Бороды, расположенного на расстоянии 300 м от входа.

Изоляты (IB-K13-1A, IB-K14, IB-K1) были выделены на питательной среде Эндо при температуре 28°С. Способность растворять ортофосфат кальция, фитиновую кислоту

³²⁴ Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

³²⁵ Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

³²⁶ Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

³²⁷ Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

³²⁸ Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия

или глицерофосфат натрия оценивали по появлению зон просветления на среде Муромцева (Кузьмина и др., 2015). Содержание ауксинов определяли с помощью иммуноферментного анализа в соответствующей тест-системе (Кузьмина и др., 2022). Влияние бактериализации семян на развитие и продуктивность растений в почве изучали на твердой яровой пшенице *Triticum durum* Desf. (сорт Башкирская 27). Семена обрабатывали бактериальной биомассой, создавая плотность инокулята 10^4 – 10^6 КОЕ/семя. Полевые опыты проводили в 2015-2019 годах на территории Уфимского района Республики Башкортостан.

Результаты. Из грунта афотической части естественной спелеосистемы Киндерлинская было выделено несколько изолятов, способных растворять соединения фосфора и переводить его в доступную для растений форму (Кузьмина и др., 2015). Наиболее активные штаммы, растворяющие органические и минеральные соединения фосфора за счет выделения кислот, были идентифицированы как *Advenella kashmirensis* IB-K1 (LT617887, B-3251) (Gilvanova et al., 2016a), *Pseudomonas extremaustralis* IB-K13-1A (LT617886.1, B-3249) (Gilvanova et al., 2016b) и *P. mandelii* IB-K14 (MN865836.1, B-3250) (Gilvanova et al., 2019). Виды *P. mandelii* и *P. extremaustralis* неоднократно выделялись из других пещер Южного Урала (неопубликованные данные), что позволяет считать их типичными обитателями спелеосистем.

Изучение физиологических свойств выделенных штаммов показало, что они способны к продукции фитогормонов. Культуры *P. extremaustralis* и *A. kashmirensis* характеризовались относительно высоким уровнем синтеза ауксина ($587,4 \pm 17,7$ нг/мл и 220 ± 42 нг/мл соответственно). Штаммы *A. kashmirensis* IB-K1 и *P. extremaustralis* IB-K13-1A являются умеренными галофилами (развиваются при 5-7% NaCl) (Кузьмина и др., 2018). Кроме того, исследованные штаммы, особенно *P. extremaustralis*, проявляли психротолерантные свойства и обладали устойчивым ростом при температуре 4°C.

В полевых опытах при бактериализации семян пшеницы штаммами изучаемых бактерий выявлено увеличение длины главного колоса на 6–7%. При бактериализации семян штаммом *P. extremaustralis* отмечено увеличение количества зерен в главном колосе более чем на 10%. У бактеризованных растений происходило увеличение количества продуктивных побегов (до 30%), количества семян и массы зерен (Галимзянова и др., 2018). В другом полевом опыте проводили исследование по влиянию бактериализации семян изучаемыми штаммами на рост и развитие растений на фоне искусственного засоления. Предпосевная обработка семян бактериями в условиях засоления существенно не влияла на всхожесть растений, но увеличивала показатели структуры урожая. В случае обработки *A. kashmirensis* IB-K1 и *P. extremaustralis* IB-K13-1A наблюдалась прибавка массы зерен на 20% (Архипова и др., 2019).

Таким образом, изученные бактерии, выделенные из естественной спелеосистемы, обладают рядом практически значимых полезных свойств, которые могут быть использованы в сельскохозяйственной деятельности.

Список литературы:

1. Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние обработки семян гормонпродуцирующими и фосфатмобилизующими бактериями на рост растений пшеницы при засолении в полевых условиях // Экобиотех. 2019. Том 2. № 4. С. 564–573.
2. Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р., и др. Влияние предпосевной бактериализации семян фосфатмобилизующими и ауксинпродуцирующими микроорганизмами на продуктивность пшеницы и подвижность почвенного фосфора в ризосфере // Агрохимия. 2018. № 4. С. 50–58.
3. Кузьмина Л.Ю., Высоцкая Л.Б., Галимзянова Н.Ф., и др. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующие ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия УНЦ. 2015. № 1. С. 40–52.
4. Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Галимзянова Н.Ф., и др. Характеристика нового ростостимулирующего штамма *Advenella kashmirensis* IB-K1 и оценка эффективности его применения в условиях засоления // Микробиология. 2022. Т. 91. № 2. С. 204–216.
5. Смирнов А.И., Соколов Ю.В. Карст и спелеология // Карст Башкортостана / Под ред. Абдрахманова Р.Ф. – Уфа: Информреклама, 2002. С. 301–340.
6. Хижняк С.В., Илиенц И.Р., Рубчевская Л.П., и др. Карстовые пещеры как источник психрофильных штаммов для ферментативной переработки сырья зерноперерабатывающей и плодоовощной отрасли и повышения пищевой биологической ценности продукции // Вестник КрасГАУ. 2012. № 5. С. 411–415.
7. Gilvanova E.A., Kuzmina L.Y., Galimzianova N.F., et al. *Pseudomonas mandelii* strain IB-K14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence // European Nucleotide Archive. 2019. – Accession MN865836.1.
8. Gilvanova E.A., Kuzmina L.Y., Galimzianova N.F., et al. *Pseudomonas extremaustralis* partial 16S rRNA gene, strain IB-K13-1A // European Nucleotide Archive. 2016a. – Accession LT617886.
9. Gilvanova E.A., Kuzmina L.Y., Galimzianova N.F., et al. *Advenella kashmirensis* partial 16S rRNA gene, strain IB-K1 // European Nucleotide Archive. 2016b. – Accession LT617887.
10. Ghosh S., Kuisiene N., Cheeptham N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? // Biochemical Pharmacology. 2016. V. 134. P. 18–34.
11. Maciejewska M., Adam D., Martinet L., et al. A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable Streptomyces Isolated from Cave Moonmilk Deposits // Frontiers in Microbiology. 2016. V. 7 N. 1455. P. 1–19.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ НАНОТЕЛА Nb6 В E.COLI

А.А. Садова³²⁹, Д.А. Дмитриева³³⁰, А.В. Мишин³³¹

С каждым годом в структурной биологии все большую популярность получает использование нанотел – переменных фрагментов тяжелых цепей особых антител, в природе встречающихся у животных семейства верблюдовых и акул [1]. В биотехнологии используется ряд методов для получения рекомбинантных нанотел с желаемой специфичностью и аффинностью. Одним из подходов оптимизации нанотел является метод фагового дисплея, который позволяет получить антительные фрагменты, обладающие высокой аффинностью к конкретным участкам белков в определенных конформационных состояниях. Малые размеры нанотел и их высокая селективность позволяют применять их для структурных исследований как методом рентгеновской кристаллографии, где они могут облегчить формирование кристаллизационных контактов, так и методом криоэлектронной микроскопии (CryoEM), что особенно важно для белков с малыми выходами, не позволяющими вырастить кристаллы. Для CryoEM нанотела также могут помочь увеличить размер исследуемого белка и задать выделенное направление, что во многих случаях существенно облегчает или даже принципиально делает возможной обработку данных.

Нанотело Nb6 было получено для каппа-опиоидного рецептора, сопряженного с G-белком (GPCR), класса A [2]. Оно связывается с 3 внутриклеточной петлей рецептора и стабилизирует его неактивное состояние. Благодаря консервативности внутриклеточных участков GPCR класса A, эта петля может быть перенесена в другие рецепторы этого класса без потери их функциональности [3]. Таким образом, нанотело Nb6 может являться универсальным партнером для широкого класса белков и может быть использовано для исследования их неактивных конформаций аналогично G-белкам, стабилизирующим активные состояния. Изучение GPCR в неактивных конформациях, в том числе в комплексах с лигандами-антагонистами, также необходимо для создания лекарств, ведь GPCR являются наиболее популярными мишенями драг-дизайна [4].

³²⁹ Лаборатория структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком, Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³³⁰ Лаборатория структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком, Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

³³¹ Лаборатория структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком, Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

На данный момент условия экспрессии нанотел только совершенствуются. Каждое нанотело требует индивидуального подбора условий, и даже улучшенные протоколы дают выход в среднем 3 мг белка с литра культуры [5]. Поэтому целью данной работы стал подбор оптимальных условий экспрессии для достижения выхода нанотела Nb6, достаточного для проведения структурных исследований. Для экспрессии нанотела в клетках *E.coli* NiCo21(DE3) была использована конструкция с последовательностью, кодирующей Nb6 в векторе pET-26b(+). В работе исследовалось влияние таких параметров как концентрация индуктора ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), оптическая плотность клеток в момент индукции, время экспрессии белка, температура и число оборотов в минуту шейкера-инкубатора на уровень экспрессии Nb6.

Метод структурного анализа GPCR с замещенной 3 внутриклеточной петлей при помощи Nb6 очень многообещающий, так как позволяет подойти к вопросу решения структуры с разных сторон. Получение нанотела Nb6 в достаточных количествах позволит изучить его применение для многих рецепторов GPCR и внесет вклад в дальнейшее развитие структурной биологии.

Список литературы:

- [1] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. //Annu Rev Biochem, 2013. Vol. 82. P. 775-797.
- [2] Che T. et al. Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor // Cell, 2018. Vol. 172, № 1–2. P.55-67.e15.
- [3] CheT. et al. Nanobody-enabled monitoring of kappa opioid receptor states. // Nat Commun, 2020. Vol. 11, 1145.
- [4] Hauser A. S. et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. // Nat Rev Drug Discov, 2017. Vol. 16. P. 829–842.
- [5] Kariuki C. K. et al. Improving the yield of recalcitrant Nanobodies® by simple modifications to the standard protocol. // Protein Expr. Purif., 2021. Vol. 185, 105906.

МИКРООРГАНИЗМЫ В СУБАЭРАЛЬНЫХ БИОПЛЕНКАХ НА ПОВЕРХНОСТИ ПАМЯТНИКОВ ИЗ МРАМОРА И ГРАНИТА В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

К.В. Сазанова³³², М.С. Зеленская³³³, А.Л. Шаварда³³⁴, Д.Ю. Власов³³⁵

Введение. В Санкт-Петербурге сосредоточено уникальное собрание памятников, созданных из мрамора, гранита и других видов природного камня, которые подвергаются интенсивной биологической колонизации. Литобионтные сообщества включают организмы нескольких крупных таксонов грибов, водорослей, бактерий, мхов и лишайников. Помимо самих организмов на поверхности таких памятников накапливаются атмосферные загрязнения и остатки опада листьев. Формирующиеся таким образом поверхностные наслоения на границе камень–воздух называют субаэральными биопленками (САБ) (Gorbushina, 2007). Современные исследования свидетельствуют о сложном строении САБ, а для понимания их организации требуются различные методологические подходы (Villa et al., 2016).

Цель данной работы – описать таксономический и химический состав САБ на поверхности каменных памятников Санкт-Петербурга и оценить роль САБ как среды обитания организмов и фактора разрушения каменных памятников.

Материалы и методы. Образцы поверхностных наслоений отбирали с гранитных и мраморных памятников Музейных некрополей Государственного музея городской скульптуры (музейные некрополи XVIII в.), расположенного в центральной части Санкт-Петербурга.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор PowerSoil и протоколы, описанные в литературе (Владимиров и др., 2014). Бактерии были идентифицированы на основе анализа генов 16S рРНК. Секвенирование гена 16S РНК проводили с использованием системы IonTorrentPGM. Библиотеку для секвенирования гена 16S-РНК готовили путем амплификации участка V4-V5 с использованием праймеров U515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') и 926R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3'). Метагеномный анализ микромицетов в бионаслоениях проводили с использованием праймеров для амплификации сайта (ITS1–5.8 S–ITS2):

ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC
gITS7 GTGARTCATCGARTCTTTG

Секвенирование проводили с помощью системы IonTorrentPGM (LifeTechnologies). Качество фильтрации — стандарт > Q20. Часть работы, связанной с анализом, была проведена с использованием протокола Qiime. Идентификацию видов проводили с помощью алгоритма полного совпадения в DADA2 с использованием последовательностей базы данных SILVA.

Для анализа малых органических молекул в поверхностных наслоениях образцы экстрагировали метанолом, экстракты центрифугировали (10 мин, 400×g), выпаривали на ротаторном испарителе при 40°C и растворяли в пиридине (30 мкл). Для дериватизации использовали BSTFA (N,O-бис-3-метил-силил-3-F-ацетамид) (30 мкл) (инкубировали при 100 °C в течение 15 мин). Пробы анализировали методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Maestro с масс-селективным детектором Agilent 5975. Колонка HP-5MS, 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Для обработки масс-спектрометрической информации использовали программу AMDIS, стандартную библиотеку NIST2005 и библиотеку стандартных соединений БИН РАН. Количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта с использованием тридекана в программе UniChrom.

Для анализа тяжелых металлов образцы поверхностных наслоений сжигали в концентрированной HNO₃ в СВЧ минерализаторе Минотавр-2. Концентрации тяжелых металлов определяли методом электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) на приборе МГА 915 с коррекцией фона по эффекту Зеемана.

Результаты. В результате метагеномного анализа бактерий были идентифицированы представители 17 бактериальных фил. В САБ на каменных памятниках преобладают бактерии двух основных групп *Bacteroidetes* (40.5) и *Proteobacteria* (33.4%). *Actinobacteria* и *Acidobacteria* составляют значительную часть сообщества (7,5% и 6,6% соответственно). На уровне рода выявлено более 90 таксонов, большинство из которых относятся к органотрофным бактериям, характерным для почвенных местообитаний. Наиболее значимыми родами (доля не менее 1%) являются *Friedmanniella* (2.1%), *Cytophaga* (2.2%), *Hymenobacter* (5.2%), *Spirosoma* (3.7%), *Flavobacterium* (8.9%), *Pedobacter* (3.4%), *Chitinophagaceae* (6.4%), *Cyanobacteria* (2.0%), *Rubellimicrobium* (1.9%), *Sphingomonas* (2.1%), *Oxalobacteraceae* (1.2%), *Deinococcus* (3.7%).

Количество основных таксономических групп грибов в САБ составило: *Ascomycetes* – 87.8%; *Basidiomycetes* – 7.7%; *Glomeromycetes* – 0.2%, *Chytridiomycetes* – 0.6%. Наибольший процент встречаемости имели рода *Aureobasidium* (13.8%) и *Celosporium* (10.3%). Не менее пяти родов *Aureobasidium*, *Capnobotryella*, *Exophiala*, *Endoconidioma*, *Celosporium* (всего 32%) включали меланизированные темноокрашенные грибы.

Анализ малых органических молекул в образцах САБ показал доминирование сахароспиртов (эритрит, арабит, маннит, мио-инозит, хиро-инозит), сахаров (глюкоза, манноза, фруктоза, галактоза, рибоза, сахароза, мальтоза, арабиноза), аминокислот

³³² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³³³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³³⁴ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³³⁵ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

(аланин, глицин, серин, треонин, пролин), органических кислот (янтарная, глицериновая, фумаровая, лимонная, яблочная, эритроновая), жирных кислот (аС 16.0; аС 22.0; аС 26.0). Всего было обнаружено около 30 различных соединений, в том числе несколько неидентифицированных.

Методом ААС в пробах поверхностных отложений были обнаружены тяжелые металлы: Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd. Fe обнаружен в наибольшей концентрации ($32280.6 \pm 3009.0 \text{ } \mu\text{g/g}$). Cd содержался в наименьшем количестве ($8.5 \pm 9.8 \text{ } \mu\text{g/g}$). Содержание Mn, Zn и Cu составляло от 414 до $510 \text{ } \mu\text{g/g}$, а количество Pb – $122.9 \pm 6.4 \text{ } \mu\text{g/g}$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основными обитателями САБ являются темноокрашенные стрессоустойчивые грибы и органотрофные бактерии. Доминирование темноокрашенных микромицетов подтверждено также культуральными методами (Сазанова и др., 2020; Sazanova et al., 2022). В САБ накапливаются тяжелые металлы, концентрации которых потенциально токсичных элементов Zn, Cu и Pb достаточно высоки. Условия в поверхностных отложениях на поверхности камня, безусловно, олиготрофные, но все же они содержат ряд источников питания, вполне достаточный для грибов этой экологической группы. Скорее всего, основную долю обнаруженных органических веществ составляют не столько сами микроорганизмы, сколько экзогенные источники, например, лиственный опад. Кроме того, скопление опавших листьев на памятниках может объяснять присутствие базидиомицетов, а также фитопатогенов и сапротрофов на растительных остатках.

Метаболомный профайлинг бионаслоений выполнен при из средств Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-799.2021.1.4 («Метаболомика сообществ микроорганизмов литобионтных систем»). Для идентификации метаболитов использовали базы данных, созданные в ходе выполнения плановой темы БИН РАН АААА-А18-118032390136-5.

Исследование морфологических и физиологических особенностей микроскопических грибов, выделенных с поверхности камня выполнено при поддержке Комитета по науке и Высшей школе (Проект «Литобионтные микроорганизмы в урбоэкосистемах: биохимические особенности, адаптивные механизмы, стратегии формирования сообществ, вклад в процессы биоповреждений»).

Авторы также благодарны ООО «Бигль» за сотрудничество в проведении метагеномного анализа.

Список литературы:

1. Владимиров, И.А.; Матвеева Т.В.; Лутова Л.А. ПЦР в реальном времени для изучения распространения агробактерий. СПб: Галаника, 2014. 68с.
2. Сазанова К.В., Зеленская М.С., Бобир С.Ю., Власов Д.Ю. Микромицеты в биопленках на каменных памятниках Санкт-Петербурга // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54. № 5. С. 329-339.
3. Gorbushina, A. Life on the rocks. Environ. Microbiol. 2007, 9, 1613–1631.

4. Sazanova K.V. , Zelenskaya M.S., Vlasov A.D., Bobir S.Y., Yakkonen K.L., Vlasov D.Y. Microorganisms in Superficial Deposits on the Stone Monuments in Saint Petersburg // Microorganisms 2022, 10, 316. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020316>

5. Villa, F.; Stewart, P.S.; Klapper, I.; Jacob, J.M.; Cappitelli, F. Subaerial Biofilms on Outdoor Stone Monuments: Changing the Perspective Toward an Ecological Framework. BioScience 2016, 66, 285–294.

БИОДЕГРАДАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВНЕШНЕЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ И МИКРОБНОГО АГЕНТА

А.А. Самков³³⁶, Ю. А. Чугунова³³⁷, М. Н. Круглова³³⁸,
Е.В. Моисеева³³⁹, Н.Н. Волченко³⁴⁰, А.А. Худокормов³⁴¹,
Е.В. Панкратова³⁴², П.А. Павлова³⁴³, Э.В. Карасева³⁴⁴

Исследовали биоэлектрохимические системы на основе микробных топливных элементов, где в анодную камеру вносили различные ксенобиотики и биологический агент, а микробиоценоз стимулировали подключением искусственного источника тока и напряжения ко внешней цепи, либо оставляли в режиме разрыва цепи или сопротивления 1 КОм. Было обнаружено влияние электрической стимуляции через внешнюю цепь биоэлектрохимической системы, произведенной при помощи предварительно заряженных до напряжения порядка 1,2 вольта суперконденсаторов (ионисторов), на скорость и интенсивность обесцвечивания красителей разных типов, а также деградацию пестицида имидаклоприда. В опытах по обесцвечиванию в качестве биологического агента использовали клетки *Shewanella oneidensis* MR-1, либо микрофлору донных отложений пресноводного водоема. При обесцвечивании кристаллического фиолетового, являющегося трифенилметановым красителем, максимальная скорость обесцвечивания суспендированными клетками *S. oneidensis* MR-1 составила $2,05 \pm 0,07$ мкМ/ч и была отмечена в случае подключения источника постоянного напряжения прямой полярности, то есть отрицательным полюсом к аноду, положительным к катоду. Одни из минимальных скоростей наблюдались в случае обратной полярности подключения, то есть при подключении отрицательного полюса источника тока и напряжения к катоду, положительного к аноду. В случае иммобилизованных на аноде клеток удельная скорость была

выше, достигая $2,91 \pm 0,09$ мкМ/ч и не снижалась при повышении концентрации субстрата. Наименьшие показатели удельной скорости были отмечены также для обратного подключения источника напряжения. В случае обесцвечивания конго красного, являющегося азокрасителем, максимальные значения скорости отмечены для источника с прямым подключением и разомкнутой цепи ($0,26 \pm 0,01$ и $0,29 \pm 0,02$ мкМ/ч соответственно), минимальное значение $0,11 \pm 0,02$ мкМ/ч – для обратного подключения суперконденсатора. Для продуктов биоэлектрокаталитического обесцвечивания кристаллического фиолетового обнаружено значительное снижение интенсивности главного пика поглощения, соответствующего полосе 590 нм, практически без характерного для частичной деградации хромогенной группы гипсохромного сдвига. О качественных изменениях состава продуктов обесцвечивания говорит появление, для варианта с прямой полярностью подключения ионистора, нового максимума поглощения в районе 360 нм. При использовании микрофлоры донных отложений были обнаружены сходные результаты, при этом меньшая степень влияния может быть связана с меньшим количеством клеток, фактически помещенных в анодную камеру, а также меньшей степенью выраженности экзоэлектрогенных свойств данной микрофлоры, в отличие от *Shewanella oneidensis* MR-1. Биodeградация имидаклоприда, проводившаяся в долговременном (десятки суток) эксперименте, проведенном по сходной схеме и оценивавшаяся по снижению высоты основного пика поглощения в одном растворе, на длине волны 269-270 нм, также показала влияние внешней электрической стимуляции на интенсивность данного процесса.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

³³⁶ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³³⁷ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Россия

³³⁸ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³³⁹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³⁴⁰ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³⁴¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³⁴² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³⁴³ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

³⁴⁴ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МОДЕЛИ ХРОМОФОРНОГО ЦЕНТРА БАКТЕРИАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ

А.Я. Сафинова³⁴⁵, Н.Е. Беликов³⁴⁶, Л.Е. Петровская³⁴⁷,
А.Ю. Лукин³⁴⁸, О.В. Демина³⁴⁹, С.Д. Варфоломеев³⁵⁰, А.А. Ходонов³⁵¹

Для реализации исследований в перспективном направлении бионанопотоники - оптогенетики необходимо создание технологий получения фотопереключаемых компонентов с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами на основе новых модифицированных представителей микробных родопсинов. Направленные изменения фотохимических свойств микробных родопсинов могут быть достигнуты путем использования следующих подходов: 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфичного мутагенеза; 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги; 3) сочетанием вышеперечисленных методов. Как было показано ранее, процедура направленной модификации хромофора позволяет варьировать в широких пределах как положение максимума поглощения основного состояния пигмента, так и другие важные фотохимические параметры.

Цель настоящей работы заключалась в получении аналога ретиналя -(2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,3,6,7-тетрагидро-1H,5H-пиридо[3,2,1-ij]хинолин-9-ил)нона-2,4,6,8-тетраеналя (1), в изучении его спектральных характеристик. Замена фрагмента триметилциклогексенового кольца молекулы природного ретиналя на мощный электроно-донорный юлолидиновый заместитель должно оказать сильное влияние на оптические параметры и спектральные свойства целевого альдегида (1), его модельных альдиминов с н-бутиламином. Ключевые стадии синтеза юлолидинового аналога ретиналя (1) представлены на схеме 1. На первой стадии нами было осуществлено олефинирование по Хорнеру-Эммонсу исходного 9-формил-юлолидина (2) анионом C5-фосфонатного синтона с нитрильной терминальной полярной группой (3a, b). В качестве основания при гене-

рировании аниона C5-фосфоната использовали LiOH в THF, при этом было показано, что в результате реакции Хорнера-Эммонса вновь образующаяся C=C связь в продукте (4) имела E-конфигурацию, что подтверждалось значениями констант спин-спинового взаимодействия (16.2 Гц). Затем следовала стадия восстановления нитрильной функции DIBAH при температуре от -70° до -80°C. Повторение указанной последовательности операций - олефинирования альдегида (5) по Хорнеру-Эммонсу и последующего восстановления нитрильной функции у соединения (6) - приводила к получению целевого ретиноида (1) с общим выходом 19% на исходный альдегид (2). Индивидуальный all-E-изомер ретиноида (1) был выделен с чистотой 98-99% при помощи препаративной ВЭЖХ. Его структура была подтверждена набором физико-химических методов анализа (УФ-, 1H-ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией).

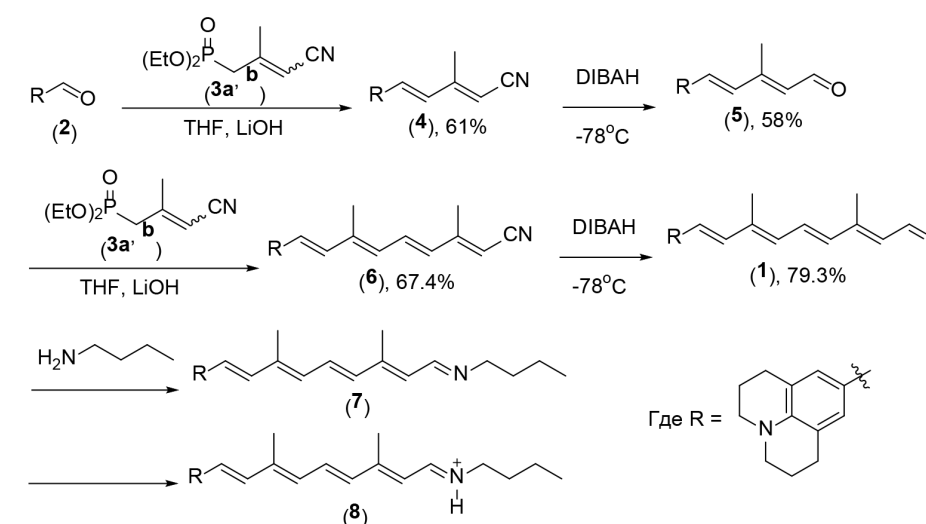


Схема 1.

Хорошо известно, что хромофорной группой микробных родопсинов является протонированный альдимин ретиналя с ε-аминогруппой определенного остатка Lys полипептидной цепи белка, то при определении степени влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретиналя часто проводят сравнение оптических параметров исходного белка мишени с параметрами его моделей - протонированных альдиминов ретиналя или его аналогов с простейшими аминами (чаще с н-бутиламином в органических растворителях). В данной работе было получено модельное основание Шиффа (альдимин) целевого с н-бутиламином. При образовании альдимина из полиеналя (1) и н-бутиламина в электронных спектрах поглощения наблюдался гипсохромный сдвиг на 30 нм. Спектры поглощения полученных препаратов альдегида (1) и альдимина (7) были исследованы при помощи стационарной УФ-ВИД-спектроскопии в диапазоне 250-700 нм в абсолютном метаноле. Последующее его протонирование альдимина (7) растворами HCl/в диоксане или TFA/в метаноле сопровождается батохромным сдвигом от 430 нм до 592(597) нм, величина которого

³⁴⁵ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет, Москва, Россия

³⁴⁶ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

³⁴⁷ ФГБУН Институт биохимической физики им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³⁴⁸ ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет, Москва, Россия

³⁴⁹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

³⁵⁰ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

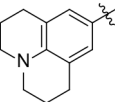
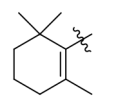
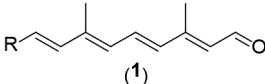
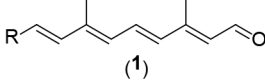
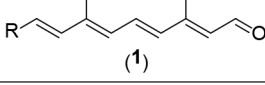
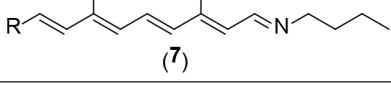
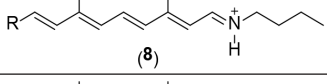
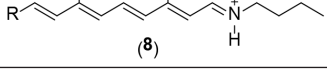
³⁵¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

зависит как от особенностей структуры аналога ретиналя, так и от природы протонирующего агента и растворителя. Обнаружены выраженные различия в спектральном поведении препаратов альдегида (1) и альдимины (7) с соответствующими производными природного ретиналя (см. табл. 1).

Таким образом, нами была создана модель влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретиналя в микробных родопсинах с использованием юлолидинового аналога ретиналя (1) и его альдиминов (7,8). Результаты введения мощного электроно-донорного юлолидинового заместителя вместо триметилциклогексенового кольца природного хромофора демонстрируют такое же увеличение величины максимума основной полосы поглощения протонированного альдимины юлолидинового аналога ретиналя (8) и его (батохромного сдвига) до λ 592–597 нм ($\Delta\lambda$ 162–167 нм), превышающее значение $\Delta\lambda$ в различных представителях микробных родопсинов (110–130 нм), при образовании протонированной альдиминной связи из природного ретиналя и апобелка. Интересно также отметить, что протонирование атома азота в самом юлолидиновом аналоге (1) растворами HCl/в диоксане или TFA/в метаноле наоборот сопровождается гипсохромным сдвигом (- 115 нм).

Таблица 1.

Параметры спектров поглощения модельных: альдегида (1) и альдиминов с н- бутиламином (7,8).

Соединение	λ_{max} (нм) в MeOH Где R = 	λ_{max} (нм) в MeOH Где R = 
 (1)	460 (345)	380
 (1)	345 (334; 345; 615) протонирование HCl в диоксане	-
 (1)	345 (335; 345; 625) протонирование TFA в MeOH	-
 (7)	430 (329; плечо 620)	350
 (8)	592 (387; плечо 358) протонирование HCl в диоксане	440
 (8)	597 (386; плечо 364) протонирование TFA в MeOH	460

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00139а).

СООБЩЕСТВО УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

У.И. Сафьянникова³⁵², Л.Э. Алескерова³⁵³

Ежегодно в мире фиксируется более 100 крупных техногенных аварий, приводящих к масштабным разливам нефти и нефтепродуктов [1]. Загрязнение окружающей среды нефтепродуктами приводит к уменьшению видового разнообразия и ухудшению экологического состояния. Биологические методы ликвидации последствий таких аварий являются наиболее безопасными [2]. В РФ температура на большей части территорий не поднимается выше 20 °С и поэтому актуально выделение и изучение психрофильных штаммов углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и разработка на их основе биопрепаратов. Использование УОБ, иммобилизованных на полимерных носителях увеличивает эффективность биоремедиации за счет сорбирующих свойств носителя и высокой доступности углеводородов для УОБ, позволяет избавиться также от нефтяной пленки на поверхности воды.

Целью настоящего исследования являлось охарактеризовать углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и смоделировать возможность создания биокомпозитного материала на основе нетканых полимерных материалов.

Из нефтепродуктов, собранных на механическом дворе ББС имени Н.А.Перцова, микробиологическими методами выделена и идентифицирована на основе гена 16 S рРНК ассоциация УОБ, состоящая из двух культивируемых штаммов – *Herminiimonas* sp. и *Pseudomonas* sp. [3] Биомасса выделенных УОБ изучена метабаркодингом по гипервариабельному участку V4 фрагмента гена 16 S рРНК (на платформе Illumina). [4] По результатам метабаркодинга установлено, что в состав ассоциацию входят не только культивируемые, но и 2 некультивируемых штамма бактерий, относящиеся к pp. *Microbacterium* и *Brevundimonas*. (рис.1)

Культивируемые штаммы УОБ проверены на способность к росту на плотной среде Эванса в присутствии углеводородов разных групп, изучены особенности их роста при 5, 20 и 27 °С. Установлено, что при 5°С экспоненциальная фаза роста (ЭФР) культивируемых штаммов УОБ составляет 200 часов, а стационарная фаза (СФ) длится около 25 суток, тогда как при 20 и 27 °С ЭФР составляет 72 часа, а СФ -4–10 часов, а затем

³⁵² Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, г. Москва, Россия

³⁵³ Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, г. Москва, Россия

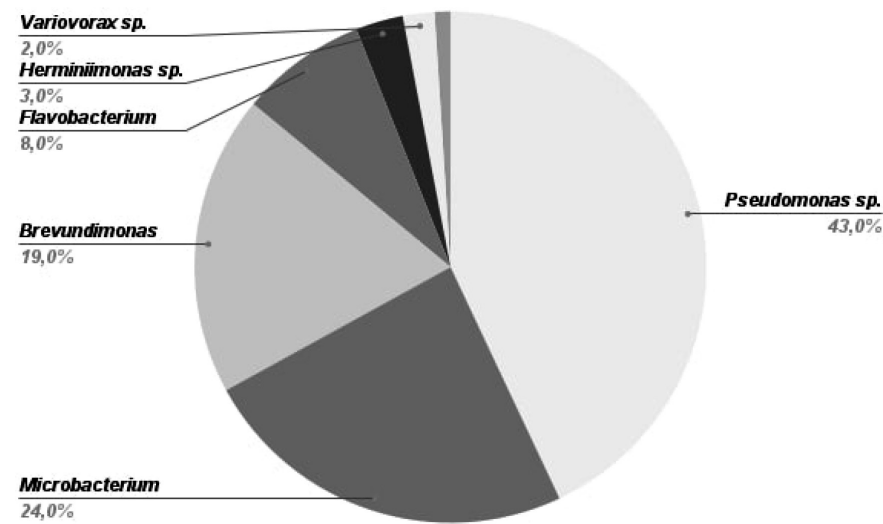


Рис.1. Состав природной ассоциации УОБ на уровне родов, установленный методом метабаркодирования

лизируются. Это свидетельствует о психротолерантности штаммов УОБ, что делает перспективным их использование в качестве УОБ в условиях Арктики. [5] Изучена эмульгирующая активность и показатель гидрофобности выделенных штаммов УОБ. Проведена иммобилизация, выделенных штаммов на нетканых полимерных сорбентах на основе полипропилена, полиэтилена и полиэтилена с добавлением 25% свекольного жома. Показано, что иммобилизация УОБ на сорбентах сопровождается формированием биопленок как на поверхности волокон сорбентов в виде грибовидных тел, так и в межволоконном пространстве в виде флоккул. В составе внеклеточного полимерного матрикса биопленок обнаружены кислые экзополисахариды. Показана стабильность УОБ в составе полученных биокomпозитных сорбентов.

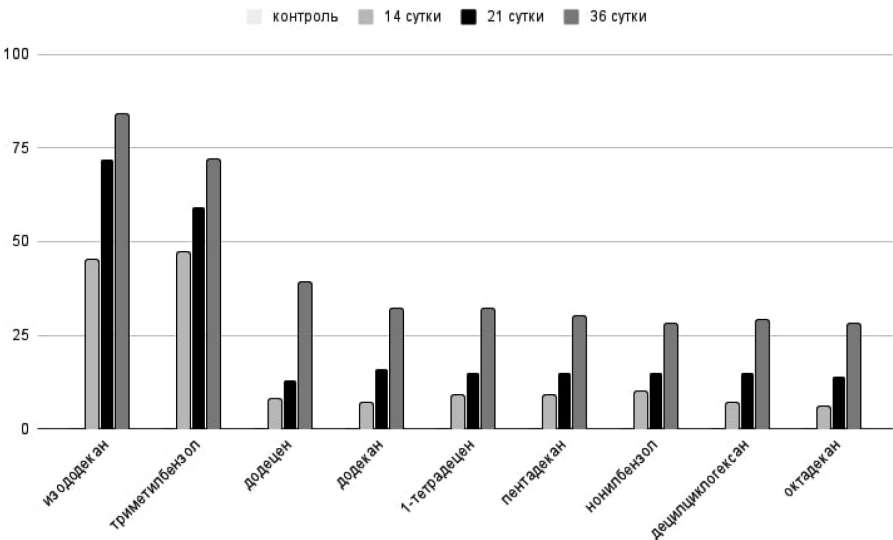


Рис.2. Количество использованной модельной смеси углеводородов (в %) при 5°C

Методом газожидкостной хроматографии была исследована эффективность деградации различных классов углеводородов из модельной смеси (предельные, непредельные, циклические, ароматические). Показано, что уже на 14 сутки большинство фракций модельной смеси УВ деградировано более чем на 50% при температуре 20°C и более чем на 25% при 5°C, что свидетельствует о высокой активности природной ассоциации УОБ к биodeградации нефтепродуктов. (Рис.2)

Список литературы:

1. Владимиров В.А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования. 2014 №1.
2. Жуков Д.В. и другие. Кинетические закономерности биodeградации алифатических углеводородов бактериями *Rhodococcus ruber* и *Rhodococcus erythropolis* // Прикладная биохимия и микробиология, 2007 – том 43, №6, с. 657–663
3. Современная микробиология. Прокариоты: в 2-х томах // Мир, – 2005 – 656 с.
4. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010 V. 7., № 5 - P. 335–336
5. Atlas R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation // Mar. Pollut. Bull. 1995 V. 31., № 4–12. – P. 178–182.

ЭМФОРИНОПОДОБНЫЙ БЕЛКОВЫЙ
ИНГИБИТОР ИЗ *PHOTORHABDUS LAUMONDII*
РЕГУЛИРУЕТ ТОКСИЧНОСТЬ
ПРОТЕАЗЫ S ПРИ ЭКСПРЕССИИ В *E. COLI*

А.О. Светлова³⁵⁴, М.А. Карасёва³⁵⁵, И.В. Демидюк³⁵⁶

Photorhabdus laumondii – грамтрицательная биолуминесцентная инсектопатогенная бактерия семейства *Morganellaceae*, которая широко используется как модель для изучения механизмов бактериального патогенеза. *Ph. laumondii* обладают высокой вирулентностью по отношению к широкому кругу насекомых, что определяется внушительным набором белковых и иных факторов, выделяемых бактерией при инфекции. Многие факторы *Ph. laumondii* хорошо изучено, но вклад других в механизм патогенеза насекомых пока не ясен.

Протеаза S (PrtS) – представитель цинковых металлопротеаз семейства M4, группы протеализинподобных протеаз (ППП) является одним из малоизученных белков *Ph. laumondii*. Известно, что во время инфекции уровень экспрессии PrtS повышается. Так же есть данные о том, что PrtS запускает каскад реакций приводящих к меланизации, а так же гидролизует противомикробные пептиды. Все это позволяет предполагать, что фермент регулирует иммунный ответ насекомых и, следовательно, является фактором патогенности.

У *Ph. laumondii*, как и у других бактерий, ген ППП PrtS колокализован с геном эмфориноподобного ингибитора (ЭПИ). Роль в связки «ППП↔ЭПИ» у бактерий не установлена. В то же время сделано предположение о том, что ППП обладают бактериотоксическим эффектом, а ингибитор регулирует активность фермента внутри клетки, защищая ее от пагубного действия протеазы

Чтобы проверить гипотезу о регуляторной функции ЭПИ гены PrtS и ЭПИ из *Ph. laumondii* (Phin) были экспрессированы в клетках *E. coli*. Для экспрессии был использован штамм *E. coli* T7 Express lysY/Iq и плазмидный вектор pETDuet 1 (Novagen), обеспечивающие строго контролируруемую индуцируемую коэкспрессию. Были получе-

ны 4 генетические конструкции. Первая, pPrtS несла только ген PrtS. Вторая, pPhin – только ген ЭПИ. Третья, pPrtS-E/A - ген PrtS с инактивирующей мутацией Glu168-Ala в области активного центра. А четвертая, pPrtS-Phin обеспечивала совместную экспрессию генов PrtS и ЭПИ. Экспрессию перечисленных генов индуцировали добавлением в среду 1 mM Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, после чего анализировали рост бактерий и накопление целевых белков.

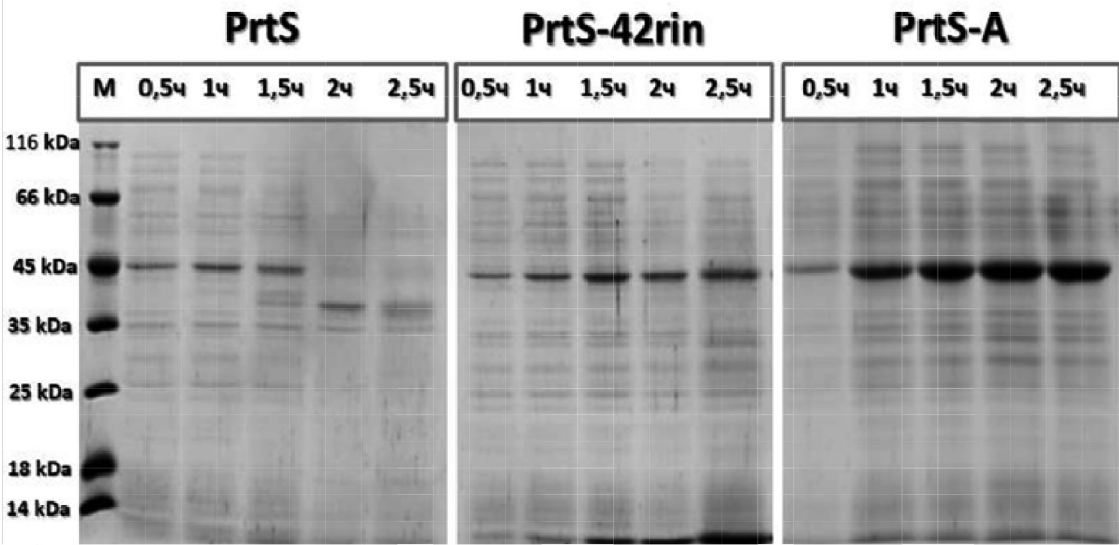
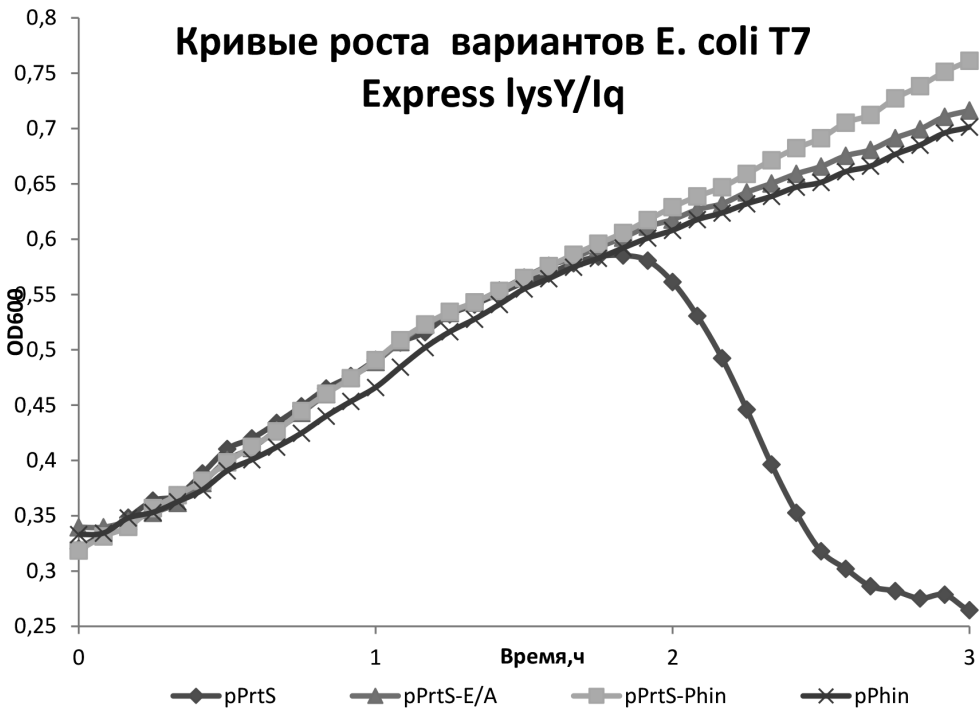


Рис. 1, 2. Кривых роста экспрессионных вариантов штамма *E. coli* T7 Express lysY/Iq и электрофоретический анализ накопления целевых белков в бактериальных клетках в ходе индукции. В случае инактивации и коэкспрессии PrtS протеаза накапливается в виде неактивного предшественника

³⁵⁴ ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия
³⁵⁵ ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия
³⁵⁶ ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

При индивидуальной экспрессии PrtS через 2 ч индукции наблюдалось резкое падение оптической плотности, свидетельствуя о гибели бактериальных клеток (рис.1А). При этом электрофоретический анализ продемонстрировал корреляцию гибели с процессингом, который, по-видимому, приводит к активации PrtS. При экспрессии инактивированного варианта PrtS-E/A токсического эффекта не наблюдалось, а протеаза при этом накапливалась в виде неактивного предшественника. Таким образом, нами впервые показано, что ППП обладает бактериотоксическим действием, которое определяется активностью фермента.

Коэкспрессия гена ингибитора с PrtS полностью подавляло токсическое действие протеазы. При этом Prt, как и в случае инактивирующей мутации накапливалась внутри в клетках в виде неактивного предшественника. Индивидуальная экспрессия Phin не оказывала заметного эффекта на клетки *E. coli*. Таким образом, в модели *E. coli* эм-фориноподобный ингибитор защищает бактерии от внутриклеточного токсического действия протеализинподобных протеаз.

Основываясь на полученных результатах можно предположить, что ЭПИ необходимы для предотвращения нежелательной преждевременной активации ППП внутри бактериальной клетки. Это не исключает возможность того, что в соответствии с выдвинутой ранее гипотезой ЭПИ являются иммунными белками неустоановленной системы межбактериальной конкуренции, в которой ППП выполняют роль бактериотоксинов. В этом случае ингибитор защищает клетки от активной протеазы, попавшей извне. Также, вполне вероятно, что ЭПИ выполняют обе функции одновременно.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РТУТИ В КОМПОНЕНТАХ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ ГИДРОТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

А.Д. Смолякова³⁵⁷

Доподлинно известно, что из металлов наиболее токсичными для микроорганизмов являются – ртуть, следующими за которой уже идут серебро, медь, кадмий, свинец, и др. Однако, в замкнутых природных циклах существуют примеры, устойчивости некоторых типов клеток к действию ионов ртути.

Ртуть в цианобактериях накапливается как на поверхности, так и внутри клеток, комплексные свойства во многом зависят от физико-химических параметров среды. Существенную роль играет рН среды и концентрация ионов металлов. Токсический эффект ионов ртути имеет прямую зависимость от времени взаимодействия, так же известно, что ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ могут играть защитную роль при воздействии ионов ртути на клетки.

Ртуть относится к химическим элементам, обнаруживающим высокую подвижность в современных гидротремальных процессах. Поэтому условия накопления и пре-распределения ртути рассматривают как индикатор тектоно-магматических условий преобразования вулканогенных пород.

Содержание и распределение ртути в компонентах среды источников свидетельствует о том, что поступление этого элемента в экосистеме данного района происходит преимущественно за счет привноса его из недр с термальными водами и дальнейшим его испарением. Концентрация химического элемента происходит преимущественно цианобактериями, переход в субстрат происходит с меньшей интенсивностью, что связано с поглощением матами элементов из воды.

Содержание Hg в исследованных образцах матов оказалось в среднем в 5 раз выше, чем в субстрате. Вегетативный мицелий, на котором образуются тела цианобактерий, находится поверх питающего субстрата и контактирует только непосредственно с водной средой, откуда и происходит поглощение. Как видно на диаграмме, содержание ртути в бактериальных сообществах напрямую зависит от температуры воды источника, чем выше температура воды, тем активнее происходит накопление, поэтому маты являются активными концентраторами Hg в термальных источниках. Наибо-

³⁵⁷ Научный руководитель: Н.В. Барановская, д.б.н., профессор Томский политехнический университет, 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30. E-mail: smolyakova-alena@mail.ru

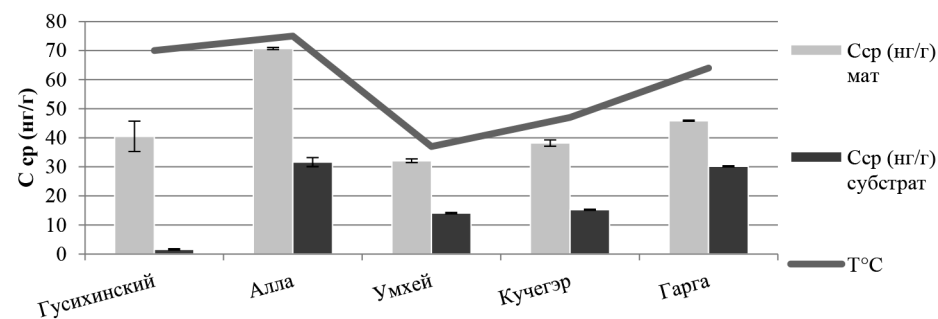


Рис. 1. Диаграмма распределения Hg в матах и субстрате термальных источников и их зависимость от температуры воды (нг/г)

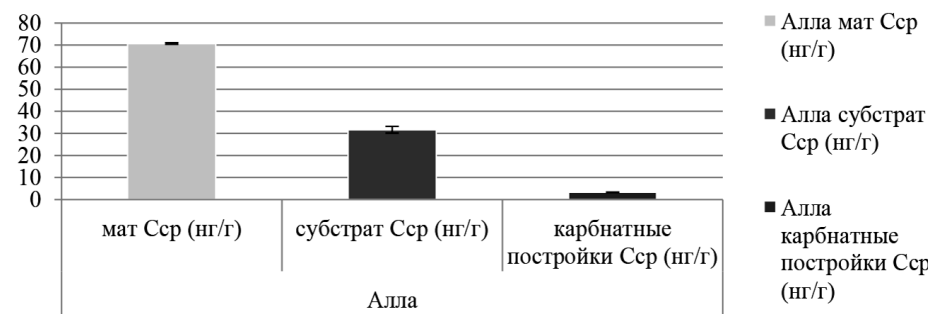


Рис. 2. Среднее содержание Hg в компонентах среды источника «Алла» (нг/г)

более высокие коэффициенты накопления имели источники: Алла, Гарга и Гусихинский; однако все полученные значения содержания Hg находились в пределах ПДК.

Согласно научным данным, чувствительность разных цианобактерий к токсическому действию ртути от 2 до 180 раз существенно отличались между собой.

В некоторых случаях наблюдается, что сульфатвосстанавливающие бактерии в анаэробных условиях восстанавливают сульфаты до сероводорода, который осаждает ионы ртути в виде нерастворимого сульфида ртути. Следовательно, особенно важное значение имеют сульфатредуцирующие бактерии в системе «вода – мат – субстрат ($t^{\circ}\uparrow - Hg\uparrow$)».

Список литературы:

1. Яппарова Э.Н. Сравнительный анализ токсического действия тонов ртути на фототрофные организмы: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Уфа, 1999

2. Багаева Т.В., Ионова Н.Э., Надеева Г.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: учеб.-метод. пособие / Т.В. Багаева, Н.Э. Ионова, Г.В. Надеева. – Казань: Казанский университет, 2013. – 56 с.

3. Пастухов М.В., Алиева В.И. Ртуть в пелагической трофической цепи озера Байкал // Тезисы докл. Междунар. конф. «Проблемы экологии. Чтения памяти профессора М. М. Кожова» (20–25 сентября). – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2010. – С. 447.

**ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ФОСФОРА
ИЗ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА ШТАММОМ
PANTOEА BRENNERI 3.5.2 И ВЛИЯНИЕ
КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ**

Л.В. Сокольникова³⁵⁸, Д.С. Бульмакова³⁵⁹, А.Д. Сулейманова³⁶⁰

Дефицит фосфора является распространенной проблемой в сельском хозяйстве. Его недостаток снижает продуктивность растительной биомассы. Более 80% фосфора в почвах находится в труднодоступном для растений виде [1]. Одним из способов решения данной проблемы является внесение в почву биоудобрений на основе фосфат-мобилизирующих микроорганизмов. Известно, что бактерии рода *Pantoea* способны к расщеплению труднодоступных соединений фосфора, а также обладают рядом других свойств, стимулирующих рост растений [2].

Целью работы было исследование высвобождения фосфатов штаммом *Pantoea brenneri* 3.5.2 на среде NBRIP с трикальцийфосфатом и влияния компонентов питательной среды на эффективность солюбилизации.

Количество свободных фосфатов измеряли на среде NBRIP с $Ca_3(PO_4)_2$. Исследование проводили в стерильных колбах при 30 °С и 200 об/мин в течение 5 суток. Количество свободных фосфатов и pH среды измеряли каждые 24 часа. Также проводили эксперименты с различными источниками углерода и азота в составе среды NBRIP. В качестве источников углерода использовали глюкозу, маннитол, сахарозу, галактозу, мальтозу, ксилозу и фруктозу, в качестве источников азота – сульфат аммония, нитрат калия, дрожжевой экстракт, пептон и мочевины. Отбор проб, измерение количества свободных фосфатов и pH среды, определение эффективности солюбилизации осуществляли на 3 сутки инкубации.

При изучении динамики высвобождения фосфатов на среде NBRIP с $Ca_3(PO_4)_2$ штаммом *P. brenneri* 3.5.2 было выявлено, что максимальное количество фосфатов наблюдалось в первые 24 часа и составляло 1253 мг/л. При этом эффективность солюбилизации составляла 87%. pH среды в течение 24 часов снижался с 7.0 до 2.85 и оставался на данном уровне на протяжении последующих суток, что коррелировало с уровнем свободных фосфатов в среде.

³⁵⁸ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

³⁵⁹ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

³⁶⁰ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

При исследовании влияния источников углерода в составе среды на эффективность солюбилизации, было обнаружено, что наибольшее количество фосфатов высвобождалось при использовании глюкозы и составляло 1168.03 мг/л, эффективность солюбилизации, составляла 74.6%. При этом pH среды снижался с 7.0 до 2.9, что является максимальным показателем по сравнению с использованием альтернативных источников углерода.

При изучении влияния источников азота в составе питательной среды на эффективность высвобождения фосфатов штаммом *P. brenneri* 3.5.2 наибольшее количество фосфатов наблюдалось при использовании дрожжевого экстракта (1219.95 мг/л), однако, в контрольной колбе также был повышен уровень свободных фосфатов (867.7 мг/л) по сравнению с другими. В состав дрожжевого экстракта входят фосфаты [3], из-за наличия которых, вероятно, увеличивалось фоновое значение фосфора в пробах. Эффективность солюбилизации составляла 40.7%, что не является максимальным показателем. Максимальная эффективность солюбилизации наблюдалась на среде с сульфатом аммония (74.6%), при этом количество свободных фосфатов находилось на уровне 1168.03 мг/л. Уровень pH среды снижался с 7.0 до 2.9. Следовательно, оптимальным источником азота для повышения эффективности фосфатсолюбилизации штаммом *P. brenneri* 3.5.2 явился сульфат аммония.

Таким образом, было установлено, что штамм *P. brenneri* 3.5.2 обладает высокой эффективностью к солюбилизации трикальцийфосфата, в процессе которой происходит снижение pH среды вдвое. Оптимальными для штамма источниками углерода и азота в составе питательной среды являются глюкоза и сульфат аммония, соответственно.

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ 21-76-00017.

Список литературы:

1. Zhu, J. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review [Text] / J. Zhu, M. Li, M. Whelan // Science of the Total Environment – 2018. – V.612. – P. 522-537.
2. Mei, C. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion In Vitro and in Greenhouse / C. Mei, R. L. Chretien, B. S. Amaradasa, Y. He, A. Turner, S. Lowman // Microorganisms – 2021. – V.9(9). – P. 1-11.
3. Thompson, K. A. Development and experimental validation of the composition and treatability of a new synthetic bathroom greywater (SynGrey) [Text] / K. A. Thompson, R. S. Summers, S. M. Cook // Environmental Science Water Research & Technology – 2017. – V.6. – P.1120-1131.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

В.В. Суворова³⁶¹

Одной из актуальных проблем микробиологии является частое различие «оптимальных» условий культивирования в лаборатории с природными условиями, в которых микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию стрессовых факторов внешней среды. В природе выживание в изменяющихся условиях среды – достаточно распространённый факт. К стрессорам относятся воздействия, приводящие к снижению или ингибированию роста. Исследование адаптационных механизмов представляется актуальным, поскольку именно в стрессовых условиях микроорганизмы способны осуществлять процессы, важные для человека: трансформацию токсичных соединений, синтез и накопление различных метаболитов.

Цель данной работы – исследование влияния стрессовых факторов окружающей среды на бактерии рода *Rhodococcus*, а также изучение их адаптивного ответа на окислительный и температурный стрессы.

В качестве объекта исследования были взяты грамположительные неспорообразующие бактерии *Rhodococcus erythropolis* X5, которые входят в состав биопрепарата от нефтезагрязнений «МикроБак» [1]. Культивирование проводили в богатой мясо-пептонной среде Luria-Bertani (LB) и в жидкой минеральной среде Эванса (E). Единственным источником углерода и энергии являлся гексадекан (2% по объёму).

Условия окислительного стресса были смоделированы путём инкубирования клеток в присутствии H₂O₂. Перекись водорода добавляли в среду сразу после засева клеток до конечной концентрации 25 и 50 mM. Полученную суспензию клеток в K₂Na-фосфатном буфере (pH 7,0) разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Q125 Sonicator («Qsonica», США) при охлаждении с циклом 10–20с (разрушение-релаксация) и амплитудой 80%. Затем образцы центрифугировали на лабораторной центрифуге MPW (MPW Med, Польша) 12000g 5 мин при 4°C. Полученный бесклеточный экстракт далее использовали для определения активности фермента.

Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6) проводили спектрофотометрическим методом по степени разрушения пероксида водорода [2], используя спектро-

³⁶¹ ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

фотометр ПЗ-5400 УФ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при температуре 25°C с длиной волны 240 нм. Активность каталазы рассчитывали, учитывая коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода $\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ на 1 мг белка.

Полученные результаты по измерению активности каталазы в бесклеточных экстрактах представлены на рисунке 1.

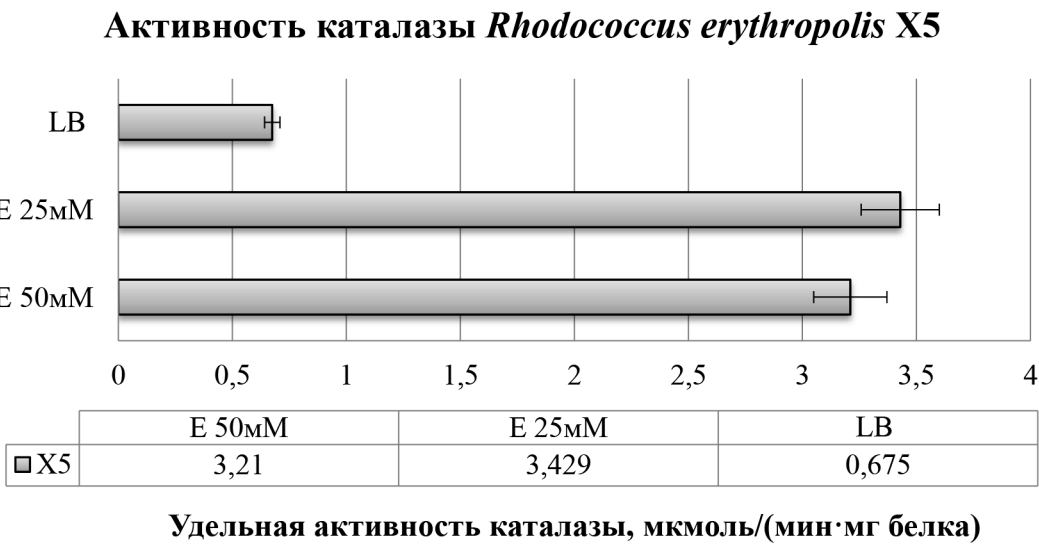


Рис. 1. Активность каталазы у бактерий *Rhodococcus erythropolis* X5

Обнаружено, что в клетках, выращенных в богатой среде (LB), активность каталазы различалась в параллельных образцах в 5 раз, но фермент достоверно выявлялся. В клетках, выращенных на гексадекане с H_2O_2 в концентрации 25 мМ, активность каталазы была незначительно выше, чем при росте с концентрацией перекиси водорода 50 мМ. Инкубирование с H_2O_2 клеток *R. erythropolis* X5 показывает высокую активность каталазы по сравнению с культивированием на богатой среде. Данные результаты сопоставимы с ранее полученными [3], где активность каталазы у бактерии *R. opacus* 1CP, выращенной на бензоате, также была в 2–3 раза выше, чем в клетках, выращенных на LB. Также в работе [4] каталаза у *R. rubropertinctus* была достоверно обнаружена.

Изучение влияния температуры проводили путём определения жирнокислотного состава клеток на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором «Хроматэк-Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) [5]. Состав жирных кислот *R. erythropolis* X5 при различных температурах состоял в основном из пальмитиновой кислоты (C16:0), стеариновой кислоты (C18:0), гексадеценовой кислоты (C16:1) и октадеценовой кислоты (C18:1). Было показано, что при воздействии пониженных температур, обнаруживалось большее разнообразие ненасыщенных жирных кислот, чем при обычной температуре. Данная тенденция является механизмом адаптации к пониженной температуре, что сопоставляется с данными других авторов [6,7].

Таким образом, стрессовые воздействия окружающей среды на микроорганизмы приводят к резкому изменению их биохимических свойств. Бактерии рода *Rhodococcus* с их способностью переживать неблагоприятные условия подходят для применения в биотехнологических процессах, где требуется длительное сохранение метаболической активности клеток, например, в технологиях очистки почв и загрязненных вод в неблагоприятных условиях окружающей среды, что отражается в данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Список литературы:

1. Фомичева Н. В., Рабинович Г. Ю., Смирнова Ю. Д., Филонов А. Е. Новые биосредства для ремедиации нефтезагрязнённой почвы //Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2020. – Т. 31. – С. 19–29.
2. Aebi H. Catalase in vitro //Methods in enzymology. – Academic press, – 1984. – Т. 105. – С. 121–126.
3. Соляникова И. П., Сузина Н. Е., Емельянова Е. В., Поливцева В. Н., Пшеничникова А. Б., Лобанок А. Г., Головлёва Л. А. Морфо-физиологические и биохимические характеристики штамма *Rhodococcus opacus* 1CP – деструктора бензоата – в стрессовых условиях //Микробиология. – 2017. – Т. 86. – №. 2. – С. 188–200.
4. Гоголева О. А., Немцева Н. В., Бухарин О. В. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий //Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – №. 6. – С. 612–612.
5. Eder K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters //Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1995. – V. 671. – №. 1–2. – P. 113–131.
6. Wang C., Chen Y., Zhou H., Li X., Tan Z. Adaptation mechanisms of *Rhodococcus* sp. CNS16 under different temperature gradients: Physiological and transcriptome // Chemosphere. – 2020. – Т. 238. – С. 124571.
7. Patek M., Grulich M., Nesvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains //Biotechnology Advances. – 2021. – Т. 53. – С. 107698.

НОВЫЙ ВИД ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА METHYLOMONAS С ВЫСОКИМИ РОСТОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Р.З. Сулейманов³⁶², И.Ю. Ошкин³⁶³, Е.Н. Тихонова³⁶⁴, С.Н. Дедыш³⁶⁵

Аэробные метанотрофы – это группа бактерий, обладающих способностью использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии, что делает их высоко востребованными в биотехнологиях, основанных на использовании природного газа. Одним из важных предпосылок для развития подобных биотехнологий является наличие штаммов-продуцентов с требуемыми физиологическими и ростовыми характеристиками. Наиболее востребованы термотолерантные или умеренно термофильные метанотрофы, обладающие высокими скоростями роста, однако число таких штаммов ограничено.

Целью настоящей работы являлся поиск новых термотолерантных метанотрофных бактерий с высокими ростовыми характеристиками и анализ их геномного потенциала.

Для получения накопительных культур метанотрофных бактерий использовали образцы донных осадков пресноводного озера Краснодарского края (44°41'50.8»N 39°18'49.9»E). Аликвоты осадков (20 мл) вносили во флаконы объемом 500 мл, добавляли 100 мл минеральной среды NMS (pH 6.5) и доводили содержание метана в газовой фазе до 30 об. %. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе Biosan ES-20/60 при 150 об/мин при температурах инкубации 35°C и 42°C. Получение изолятов метанотрофных бактерий проводили с использованием разбавленной в соотношении 2:5 жидкой минеральной среды NMS и многократных предельных разведений накопительных культур. Идентификацию изолятов проводили путем сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Определение последовательности генома проводили с использованием платформ Illumina MiSeq и Oxford Nanopore.

В результате работ по культивированию из исследованных образцов озерных осадков был получен изолят метанотрофных бактерий рода *Methylomonas*, штамм MP1^T.

Представители рода *Methylomonas* – это строго аэробные, облигатные метанотрофы, населяющие широкий спектр пресноводных местообитаний. Идентификация штамма MP1^T показала, что он филогенетически отличался от описанных ранее видов рода *Methylomonas* (<97.3% сходства последовательностей гена 16S рРНК). Клетки штамма MP1^T представляли собой высоко подвижные палочки шириной 1.10 ± 0.03 мкм и длиной 2.10 ± 0.08 мкм с одним полярным жгутиком и внутрицитоплазматическими мембранами I типа. При культивировании на плотных средах эти бактерии формировали округлые красные колонии диаметром 3-5 мм.

Штамм MP1^T рос в широком диапазоне температур от 8 до 45°C, с оптимумом при 35°C, и в сравнительно узком диапазоне pH от 5.5 до 7.8, с оптимумом при 6.6–7.2. Метанол поддерживал рост в широком диапазоне концентраций, до 5% (об./об.), однако без возможности повторного пересева. В качестве источников азота новый изолят использовал нитраты, нитриты, хлорид аммония и мочевины. Рост на многоуглеродных соединениях отсутствовал. Концентрации NaCl в среде до 0.5% стимулировали рост штамма, тогда как при возрастании содержания NaCl ≥ 1 % наблюдалось ингибирование роста. Удельная скорость роста штамма MP1^T в оптимальных условиях периодического культивирования составляла 0.33 ч^{-1} . Анализ состава каротиноидов, продуцируемых штаммом MP1^T, показал наличие производных ликопина.

Секвенирование генома штамма MP1^T с помощью Oxford Nanopore дало 54 525 прочтений со средней длиной прочтений 4069 п.н. При секвенировании на платформе Illumina MiSeq было получено в общей сложности 1 304 672 прочтений средней длиной 300 п.н. Размер генома составил 4.61 млн. п.н. с содержанием пар G+C 52.8 мол.%. Анализ последовательности генома выявил три оперона рРНК и 4450 белок-кодирующих генов. В геноме имеется один оперон, кодирующий мембранную метанмонооксигеназу (ММО), тогда как кластер генов, кодирующий растворимую ММО, отсутствует. Способность к окислению метанола обусловлена наличием генов, кодирующих классическую метанолдегидрогеназу MxaFI- и альтернативную HoxF-метанолдегидрогеназу. Геном штамма MP1^T кодирует полный набор генов ферментов серинового пути, а также два гена ключевого фермента пути РМФ (3-гексулозо-6-фосфатсинтаза), что является характерной чертой видов *Methylomonas*. В геноме этого метанотрофа также обнаружены гены цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного и КДФГ путей. Наличие генов, кодирующих фосфокетотлазу и ацетаткиназу, позволяет предположить наличие у этого метанотрофа множественных гликолитических путей расщепления фосфосахаров и синтеза АТФ. Гены фиксации азота в геноме данного штамма не обнаружены.

Сравнительный анализ последовательности генома штамма MP1^T с таковыми у ранее описанных видов рода *Methylomonas* показал лишь 82–85% идентичности, на основании чего мы предлагаем классифицировать его, как представителя нового вида этого рода, *Methylomonas rapida* sp. nov. Штамм MP1^T (=VKM B-3663^T = UQM 41487^T) является типовым штаммом нового вида. Высокие ростовые характеристики этого штамма

³⁶² Институт Микробиологии им. Виноградского ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия. E-mail: suleimanov-1972@outlook.com

³⁶³ Институт Микробиологии им. Виноградского ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³⁶⁴ Институт Микробиологии им. Виноградского ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³⁶⁵ Институт Микробиологии им. Виноградского ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

позволяют рассматривать его в качестве как нового перспективного продуцента белка одноклеточных на основе природного газа.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в соответствии с соглашением № 075-15-2022-318 от 20 апреля 2022г. о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агро-технологии будущего».

**СУТОВАЦИЛЛУС ПСЕУДОСЕАНИСЕДИМИНИС,
НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНО-МЕТИЛОТРОФНАЯ
БАКТЕРИЯ С ВЫСОКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ
К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ, ВЫДЕЛЕННАЯ
ИЗ ПОДЗЕМНОГО СОЛЕНОГО ИСТОЧНИКА**

**К.А. Тарасов³⁶⁶, А.С. Яхненко³⁶⁷, М.П. Зарубин³⁶⁸,
А.М. Гангапшев³⁶⁹, Е.В. Кравченко³⁷⁰**

Жизнь в дальних уголках планеты Земля с экстремальными условиями привлекает интерес ученых в связи с астробиологическими исследованиями, а также исследованиями законов, по которым шло развитие жизненных форм на Земле. Живые организмы, обитающие в экстремальных и малоисследованных нишах обладают уникальными защитными приспособлениями, биохимическими путями и ферментами, отличающимися от тех, что имеются у организмов на поверхности. Такие системы могут быть крайне полезны для биотехнологии (Taq-полимераза, например).

В данной работе мы выделили бактерию из соленого источника дальнего тоннеля Баксанской нейтринной обсерватории ИЯИ РАН, секвенировали геном этой бактерии, провели филогенетический анализ, исследовали физиологические и хемотаксономические характеристики, провели тесты на резистентность бактерии к тяжелым металлам, предложили схему метилотрофного метаболизма бактерии. По результатам работы данная бактерия отнесена к новому виду *Cytobacillus pseudocyanisediminis* sp. nov.

Вместе с публикацией данной работы мы надеемся, что данная локация (Баксанская нейтринная обсерватория) привлечёт больше внимания биологов в связи с уникальным экспериментальным потенциалом для астробиологических, биофизических и радиобиологических исследований.

³⁶⁶ Объединённый институт ядерных исследований. E-mail: ktarasov@jinr.ru

³⁶⁷ Объединённый институт ядерных исследований

³⁶⁸ Объединённый институт ядерных исследований

³⁶⁹ Институт ядерных исследований РАН

³⁷⁰ Объединённый институт ядерных исследований

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ КОРНЕЙ ТОМАТА ПРИ ОБРАБОТКЕ ГИДРОЛИЗАТОМ ХИТОЗАНА

Т.А. Тимофеева³⁷¹, В.П. Варламов³⁷², А.М. Камионская³⁷³

Томат, *Solanum lycopersicum*, является одной из самых популярных овощных культур. При производстве томатов очень важно использовать наиболее безопасные методы защиты растений. Хитозан, как биологически безопасное для человека соединение, в полной мере удовлетворяет этим требованиям. Хитозан — природный полиаминосахарид, производный продукт хитина, который получают путем его деацетилирования. Хитозан рассматривают как биологический фунгицид, кроме того, он показал себя как стимулятор роста растений [1, 2]. В работе использовался низкомолекулярный гидролизат хитозана со средней молекулярной массой 33 кДа (индекс полидисперсности = 2,1), степень деацетилирования 95%. Гидролизат хитозана был получен путем химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана азотной кислотой [5]. Исследование проводили на семидневных проростках томата сортов Ред Черри и Лель. Через 30 минут, 24 часа и 48 часов после внесения гидролизата хитозана собирали корни на для выделения суммарной РНК. Данные экспрессии были получены при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени и нормализованы с использованием результатов экспрессии гена *EF1β2*.

Для понимания процессов, происходящих в апикальной меристеме корня томата, были выбраны следующие гены: транскрипционные факторы *PLETHORA 2* (*PLT2*), *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) и *AQC1*, продукт которого поддерживает работу ствольных клеток апикальной меристемы [3]. Экспрессия гена *WOX5* в присутствии низкомолекулярного гидролизата хитозана повышалась через 48 ч в 2,7 раз для томата сорта Ред Черри и в 9,5 раз для сорта Лель. Экспрессия гена *PLT2* в корнях томата снижается в присутствии гидролизата хитозана в течении 24 ч. Тем не менее в образцах томата сорта Ред Черри через 48 ч уровень экспрессии восстанавливается до уровня контроля, а у сорта Лель остается сниженным в 1,5 раза. Экспрессия гена *AQC1* не изменяется при внесении гидролизата хитозана.

Также была проанализирована активность генов, участвующих в биосинтезе фитогормонов томата, принимающих участие в иммунных реакциях у растений [4]. Продукт гена *AAO3* катализирует последнюю стадию пути биосинтеза абсцизовой кислоты. *MYC2* является положительным фактором транскрипции в сигнальном пути жасмоновой кислоты. *AMI1* участвует в пути биосинтеза индолилуксусной кислоты. *PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 5* (*PAL5*) участвует в фенилаланиновом пути биосинтеза салициловой кислоты.

Экспрессия генов *AAO3* и *AMI1* снижалась через 30 минут после внесения гидролизата хитозана у обоих сортов. Напротив, уровень экспрессии гена *MYC2* повышался через 30 минут после обработки. В корнях томата сорта Лель экспрессия этого гена возрастала в 2,9 раз и опускалась до контрольных значений только через 48 ч. В корнях проростков обоих сортов томата экспрессия гена *PAL5* повышалась через 30 минут после внесения гидролизата хитозана. Через 48 ч экспрессия гена *PAL5* в корнях томата сорта Ред Черри была в 1,5 раза выше контрольной. Сорт Лель напротив показал устойчивое снижение экспрессии гена *PAL5* и через 48 ч уровень экспрессии этого гена был в 1,5 раза ниже контрольного.

Таким образом изменение в экспрессии исследуемых генов в ответ на внесение гидролизата хитозана свидетельствует о его иммуностимулирующей активности. Снижение экспрессии гена *AMI1* в пути биосинтеза ауксина на фоне активации биосинтеза салициловой (*PAL5*) и жасмоновой (*MYC2*) кислот может быть причиной изменения тропизма корней томата. Сверхэкспрессия гена *WOX5* показывает влияние гидролизата хитозана на работу апикальной меристемы корня томата.

Список литературы:

1. Bautista-Baños S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities //Crop protection. – 2006. – Vol. 25 (2). – P. 108–118.
2. Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review //Indian Journal of Plant Physiology. – 2015. – Vol. 20 (1). – P. 1–9
3. Lopez-Moya F. et al. Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in Arabidopsis exposed to chitosan //Scientific reports. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 1–14.
4. Pieterse C. M. J. et al. Hormonal modulation of plant immunity //Annual review of cell and developmental biology. – 2012. – T. 28. – C. 489–521.
5. Shagdarova B. T., Il'ina A. V., Varlamov V. P. Antibacterial activity of alkylated and acylated derivatives of low-molecular weight chitosan //Applied biochemistry and microbiology. – 2016. – T. 52. – №. 2. – C. 222–225.

³⁷¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

³⁷² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

³⁷³ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ ЭНДОМИКОРИЗООБРАЗУЮЩИХ ГРИБОВ-МИКРОМИЦЕТОВ РОДА CADOPHORA НА РАЗВИТИЕ МИКРОКЛОНОВ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Ю.С. Топилина³⁷⁴, Е.А. Лукьянова³⁷⁵, Л.Б. Глухова³⁷⁶,
М.Н. Шурупова³⁷⁷, А.Л. Герасимчук³⁷⁸, Д.В. Анциферов³⁷⁹

Растения рода *Vaccinium* (такие, как брусника, черника, голубика) выращиваются повсеместно, и в России эти культуры тоже набирают популярность. Эти ягоды имеют приятный характерный кисло-сладкий вкус, а также они часто используются как в народной, так и в традиционной медицине. Все виды рода *Vaccinium* имеют особые симбиотические микоризные ассоциации с корневыми системами – эрикоидную микоризу. Эти образования улучшают поглощение питательных и минеральных веществ, а также повышают устойчивость к некоторым токсичным элементам, например, к алюминию. Из литературы известно, что в отсутствии эндомикоризообразователей эти растения хуже плодоносят и гораздо медленнее растут (Nancy et al., 2007; Xiangying et al., 2020).

Целью исследования было изучение влияния эндомикоризных грибов-микромикотомов, выделенных из корней брусники и черники, на адаптацию, рост и развитие микроклонов голубики садовой сорта 'North Blue'. Простерилизованные в растворе гипохлорита натрия и предварительно разделенные на фрагменты корни брусники и черники были посеяны на агаризованную среду Чапека-Докса с добавлением антибиотиков – цефотаксима в концентрации 300 мг/л (бактерицидное действие) и хлорамфеникола в концентрации 100 мг/л (бактериостатическое действие). Через 5–7 дней отмечено, что рост мицелия шел по всей поверхности корня. Из 10 полученных изолятов был отобран штамм BR2-1, отнесенный по результатам молекулярно-биологического анализа к эндомикоризным грибам рода *Cadophora*. Сходство последовательности гена ITS составило 98.62 % с *C. echinata* Koukol et Macia-Vicente и 98.28% с *C. gamsii* Koukol et Macia-Vicente, которые были выделены из корней растений центральной Европы

(Glynou et al., 2016). Штамм BR2-1 культивировался на трех средах: Чапека-Докса (рис. 1А), мальтозно-декстрозном агаре и картофельном агаре при комнатной температуре (20–22 °С) и pH 4,5.

В эксперименте по изучению влияния штамма BR2-1 на рост и развитие растений голубики садовой были использованы контрольная и опытная группы микроклонов с зачатками корневой системы по 30 растений в каждой. Растения были высажены в кассеты со стерильным грунтом, состоящим из торфа (pH 4.5) и вермикулита в соотношении 4:1 с добавлением комплексного удобрения Осмокот блум (2 г/л). Микроклоны из опытной группы перед посадкой были погружены на несколько секунд в суспензию из мицелия и спор штамма BR2-1. После 3-х недель культивирования показано положительное влияние штамма BR2-1 на развитие микроклонов голубики (рис. 1Г и 1Д): у опытной группы достоверное различие наблюдалось по количеству побегов (на 24,2 % больше); при этом суммарный прирост длины побегов и средний размер листа также были больше, чем у контрольной группы (на 13,3 % и 26,1 % соответственно). Методом дифференциальной окраски было подтверждено присутствие арбускул в корнях растений из опытной группы (рис. 1Б и 1В).

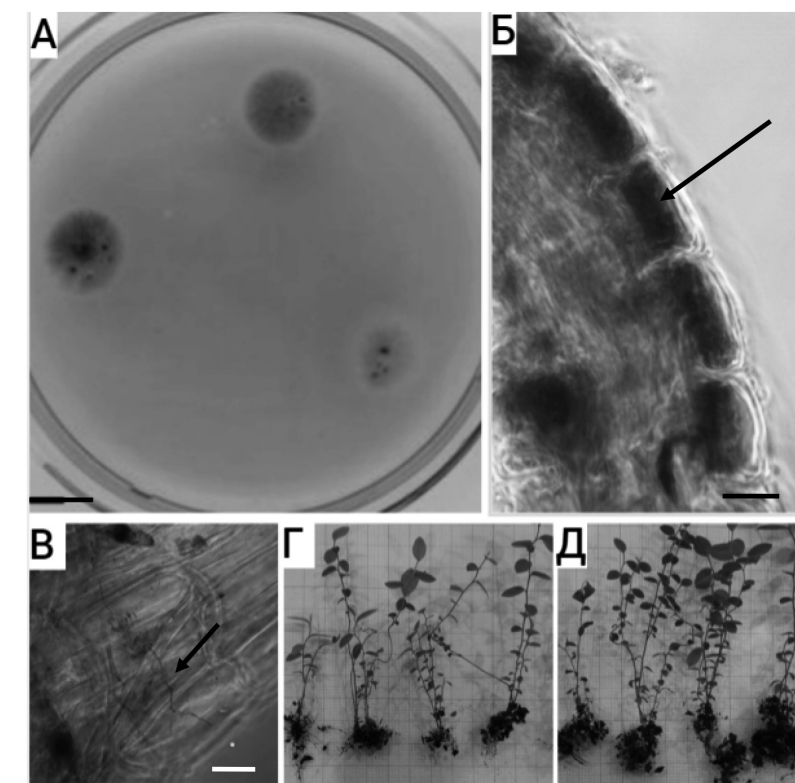


Рис. 1. Влияние штамма BR2-1 на развитие микроклонов голубики садовой.
Примечания: А – Колонии штамма BR2-1 на плотной питательной среде Чапека-Докса, размер линейки 10 мм; Б, В – окрашенные микропрепараты срезов ризодермиса корней микро растений голубики из опытной группы, показывающие присутствие эндомикоризы (арбускулы), фазово-контрастная микроскопия, размер линейки 10 мкм; микро растения голубики высокой сорта 'North Blue' после 3х недель адаптации: Г – контрольный опыт, Д – обработанные суспензией мицелия и спор штамма BR2-1

³⁷⁴ ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

³⁷⁵ ООО «Дарвин», Томск, Россия

³⁷⁶ ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия
ООО «Дарвин», Томск, Россия

³⁷⁷ ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

³⁷⁸ ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

³⁷⁹ ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия
ООО «Дарвин», Томск, Россия

Дополнительно было исследовано влияние штамма BR2-1 на другие плодовые культуры: жимолость синюю (*Lonicera caerulea* L.) и крыжовник обыкновенный (*Ribes uva-crispa* L.). Условия эксперимента были те же, что и для голубики садовой. За 7 недель наблюдения за ростом микроклонов негативного влияния эндомикоризообразователя BR2-1 на растения не обнаружено. Следовательно, можно предположить, что данный вид не является патогеном для растений данных родов.

Результаты исследования могут быть полезны для разработки биопрепарата, направленного на повышение урожайности ягодных культур рода *Vaccinium*.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

Список литературы:

1. Glynou, K., Ali, T., Buch, A.K. and Sevda, H.K. 2016. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol.* 18 (8): 2418-2434. doi: 10.1111/1462-2920.13112.

2. Nancy, C.J., Catherine, A.G., Cardon, Z., and Whitbeck, J.K. 2007. Mycorrhizas: Symbiotic Mediators of Rhizosphere and Ecosystem Processes. *The Rhizosphere.* 18 (2): 73–100. doi: 10.1016/B978-012088775-0/50006-9.

3. Xiangying, W., Jianjun, C., Chunying, Z., and Hong, L. 2020. Ericoid mycorrhizal fungus enhances microcutting rooting of *Rhododendron fortunei* and subsequent growth. *Horticulture Research.* 7 (14): 831–846. doi: 10.1038/s41438-020-00361-6.

**ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
АЭРОБНОРАСТУЩИХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA*
COLI ПРИ СТРЕССЕ ГОЛОДА ПО СУЛЬФАТУ**

А.В.Тюленев³⁸⁰, Г.В. Смирнова³⁸¹, А.О. Габова³⁸², О.Н. Октябрьский³⁸³

В естественной среде обитания бактерии постоянно сталкиваются с дефицитом компонентов, необходимых для нормальной жизнедеятельности. В процессе эволюции бактерии приобрели механизмы адаптации, позволяющие сохранять жизнеспособность в условиях голодания по тем или иным источникам питания. Первоначальный (быстрый) ответ бактерий на исчерпание в среде сульфата, и реакция на последующее возобновление роста после его внесения в питательную среду – мало изучены. Особенно это касается быстрых изменений физиологических и электрохимических параметров культуры, таких как скорость роста дыхательная активность, трансмембранная циркуляция ионов и pH и редокс-потенциала (Eh) среды. В последнее время большой интерес вызывает физиологическая роль сульфида водорода в ответе бактерий на различные стрессовые воздействия. Ранее нами было показано, что у бактерий *Escherichia coli* эндогенный сульфид может принимать участие в регуляции гомеостаза цистеина при стрессах, связанных с резкой остановкой роста. Сульфат используется в биосинтезе серосодержащих аминокислот и его исчерпание, и последующее внесение в среду является удобной моделью для изучения продукции сульфида и изменения физиологических параметров в данных условиях.

Объект исследования – штамм *Escherichia coli* BW25113 («wild type», Keio collection). Бактерии культивировали в колбах в орбитальном термостатируемом шейкере при 37 °C в аэробных условиях на среде M9 с низким содержанием сульфата для индукции голодания.

Мониторинг физиологических параметров отслеживали в реальном времени с применением электрохимических ион-селективных сенсоров, установленных непосредственно в колбах (инвазивно) с аэробно растущими культурами. Все параметры непрерывно и синхронно обрабатывались в режиме реального времени с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего несколько блоков регистрации. Непрерывную регистрацию pH, парциального давления кислорода (pO₂) (электрод

³⁸⁰ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН

³⁸¹ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН

³⁸² ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН
ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

³⁸³ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН

Кларка, «Mettler Toledo») проводили на контроллере BioFlo 110 (NBS «Eppendorf»). Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного халькогенидного электрода (S^{2-}) XC-S²-001 («Sensor Systems»), изменение редокс-потенциала (Eh) регистрировали платиновым электродом ЭРП-105 («ИТ»), экстраклеточных ионов K^{+} -селективным сенсором ЭЛИС-121K («ИТ»). Потенциометрические данные с этих электродов обрабатывались цифровыми рХ-метрами срХ-2 (ИБП, Пушино), работающими в синхронизированном режиме. Измерение оптической плотности и удельную скорость роста культуры определяли общепринятым способом.

В аэробных условиях в середине экспоненциальной фазы роста ($OD_{600nm}=0.4$), бактерии поддерживали максимальную скорость роста $\mu 0.71\pm 0.04 \text{ час}^{-1}$. Накопление биомассы и возрастающая дыхательная активность растущих клеток приводила к постепенному снижению парциального давления кислорода в среде, и, связанному с этим изменением Eh в область отрицательных значений, а также поглощению клетка ионов калия. Продукция сульфида в этих условиях поддерживалась на постоянном уровне, pH среды непрерывно снижался пропорционально накоплению биомассы. Исчерпание источника сульфата сопровождалось резкой остановкой роста (до $0.03\pm 0.01 \text{ час}^{-1}$), одновременно отмечалось увеличение pO_2 на 25%, что указывало на снижение дыхательной активности клеток. Так же отмечено снижение интенсивности входа ионов K^{+} и скорости закисления среды, что может указывать на ингибирование углеводного метаболизма при наступлении голодания. Изменение потенциала сульфид специфичного сенсора в область положительных значений указывало на сильное ингибирование продукции эндогенного сульфида клетками в данных условиях. После внесения источника сульфата в среду культура полностью возобновляла рост и дыхательную активность, на что указывало резкое снижение pO_2 на 50% с последующей стабилизацией на новом уровне. Одновременно регистрировалось возобновление поглощения ионов K^{+} , ускорение закисления pH среды и резкая стимуляция продукции эндогенного сульфида, которая продолжалась в течение 40 мин. Наблюдаемое по скачку потенциала сульфид-специфичного сенсора возрастание экстраклеточного S^{2-} может быть следствием возрастания внутриклеточного пула цистеина, синтез которого возобновлялся после внесения источника серы.

Таким образом, ранний ответ аэробнорастущих бактерий *E. coli* как на стресс голода по сульфату, так и на возобновление роста после внесения сульфата в среду сопровождается синхронными изменениями интегральных физиологических показателей и продукции S^{2-} . Ранее в наших работах была показана прямая связь между ингибированием роста и кратковременным возрастанием продукции эндогенного сульфида при различных стрессах. В данной работе впервые показано, что возобновление роста может вызывать такой же эффект.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-14-00093.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ МАКЕТОВ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТОВ ЛАККАЗ В КАТОДНОМ ПРОСТРАНСТВЕ

В.В. Федина³⁸⁴

Биологические топливные элементы (БТЭ) – это устройства, способные непосредственно преобразовывать химическую энергию в электрическую посредством электрохимических реакций, включающие биохимические пути. Уровень генерируемой выходной мощности достаточен для питания микро- и мини-масштабных электронных систем, таких как небольшие системы датчиков, микро-устройств, которые требуют относительно низкой мощности [1]. Для получения максимальной мощности БТЭ измеряют потенциал, который генерируется за счёт окисления субстратов, при помощи биоэлектрокатализатора как в анодном, так и в катодном пространстве. В качестве биокатализатора для анода использовали мембранные фракции бактерий *Gluconobacter oxydans*. Мембрана таких бактерий содержит в себе PQQ-зависимые дегидрогеназы, благодаря которым возможно широкое и быстрое окисление субстратов. Биокатализатор иммобилизовали на графитовом войлоке, который использовали в качестве электрода для анодного пространства. Закрепление осуществлялось за счёт геля хитозана с углеродными нанотрубками.

В качестве биокатализатора катодного пространства использовали бактериальные лакказы. Лакказы принадлежат к надсемейству мультимедных оксидаз – группа ферментов, содержащая множество белков с различной субстратной специфичностью и биологическими функциями. Наличие купредоксинаподобных доменов позволяет всем мультимедным оксидазам восстанавливать кислород до воды без производства вредных побочных веществ [2]. Для их закрепления на поверхности графитового стержня, который использовали в качестве электрода для катодного отделения, применялись углеродные нанотрубки (УНТ), это относительно новые наноматериалы, которые имеют уникальные структурные, механические и электронные свойства, включая улучшенную электрохимическую активность [3]. Такую систему закрепляли белковой плёнкой бычьего сывороточного альбумина (БСА) для удерживания биокатализатора на поверхности электрода.

³⁸⁴ ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Было сформировано несколько макетов БТЭ с различными бактериальными лакказами в катодном пространстве. В анодное пространство помещали графитовый войлок с иммобилизованными мембранными фракциями бактерий *Gluconobacter oxydans* на поверхность анода и закрепляли сверху токопроводящей матрицей на основе хитозана с УНТ. В качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу, которую добавляли после установления стационарного состояния электродов с медиатором электронного транспорта 2,6-дихлорфенолиндофенолом. В катодное отделение помещали биокатод с различными бактериальными лакказами, закреплёнными плёнкой БСА. Для биокатода использовали лакказы из бактерий *Catenuloplanes japonicus*, мутантные лакказы ScaSL(His/Trp) и ScaSL(His/Ala) из бактерии *Streptomyces carpinensis*.

Высокие энергетические характеристики были получены с макетом БТЭ на основе мутантных лакказ ScaSL(His/Trp), удельная мощность такого макета составила 0,156 Вт/мм², максимальная мощность 55±4(*10⁻⁴) Вт при приложенном внешнем сопротивлении 4 кОм. Генерируемый потенциал в режиме замкнутой внешней цепи составлял 153±4 мВ. Полученные энергетические характеристики данного макета сравнивались с макетом БТЭ на основе мутантной лакказы ScaSL(His/Ala), где удельная мощность составила 0,142 Вт/мм², максимальная мощность 50±5(*10⁻⁴) Вт при приложенном внешнем сопротивлении 5,1 кОм. Генерируемый потенциал в режиме замкнутой внешней цепи составлял 157±8 мВ. Можно заметить, что производительность макетов БТЭ незначительно отличается между собой, однако с мутантными лакказами ScaSL(His/Trp) удельная мощность несколько выше с внешним сопротивлением 4 кОм, чем с использованием мутантной лакказы ScaSL(His/Ala), где внутреннее сопротивление ячейки повышается до 5,1 кОм с удельной мощностью 0,142 Вт/мм² (рис. 1).

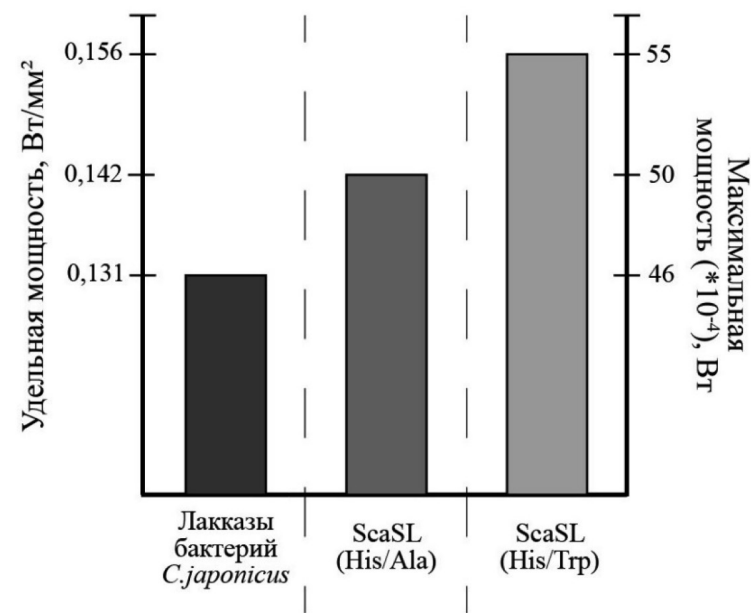


Рис. 1. Диаграмма сравнения производительности БТЭ с различными бактериальными лакказами в катодном пространстве

Самая низкая производительность была зафиксирована для макета БТЭ с лакказами бактерий *Catenuloplanes japonicus*. Его генерируемый потенциал в режиме замкнутой цепи составил 159±6 мВ. Удельная мощность равна 0,131 Вт/мм², максимальная мощность 46±6(*10⁻⁴) Вт при приложенном внешнем сопротивлении 6 кОм. Таким образом, при использовании лакказ с заменой аминокислотной последовательности, производительность БТЭ повышается практически в 1,5 раза, при этом уменьшается внутреннее сопротивление ячейки, по сравнению с макетом БТЭ, где были иммобилизованы природные бактериальные лакказы на электроде. При использовании таких ферментов увеличивается скорость переноса электронов в катодном пространстве, что позволяет повысить энергетические характеристики БТЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Список литературы:

1. Brunel L. et al. Oxygen transport through laccase biocathodes for a membrane-less glucose/O₂ biofuel cell // *Electrochemistry Communications*. – 2007. – Т. 9. – №. 2. – P. 331–336.

2. Janusz G. et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Т. 21. – №. 3. – P. 966.

3. Tasis D. et al. Chemistry of carbon nanotubes // *Chemical reviews*. – 2006. – Т. 106. – №. 3. – P. 1105–1136.

SULFUROSPIRILLUM TAMANENSIS SP. NOV. – НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНО АНАЭРОБНАЯ, АЛКАЛИФИЛЬ- НАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ НАЗЕМНОГО ГРЯЗЕВОГО ВУЛ- КАНА ТАМАНСКОГО ПОЛУОСТРОВА

А.А. Фролова³⁸⁵, А.Ю. Меркель³⁸⁶, В.В. Кевбрин³⁸⁷,
Д.С. Копицын³⁸⁸, А.И. Слободкин³⁸⁹

Грязевой вулканизм представляет собой широко распространенное геологическое явление: на Земле насчитывается свыше 1700 наземных и подводных грязевых вулканов. Таманский полуостров - один из регионов с наиболее интенсивным грязевым вулканизмом, здесь находятся более ста наземных грязевых вулканов. Микробиологические исследования данного региона привели к выделению ряда чистых культур микроорганизмов, представляющих собой новые таксоны различного порядка.

Из наземного грязевого вулкана Гнилая гора, г. Темрюк (Краснодарский край, РФ) методом предельных разведений была выделена чистая культура (штамм T05b^T) с лактатом в качестве донора и нитратом в качестве акцептора электронов. Новый изолят имеет 98.61% сходства нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с *Sulfurospirillum alkalitolerans* (филум “*Campylobacterota*”) – анаэробной нитратвосстанавливающей бактерией. Клетки штамма T05b представляют собой подвижные, Грамм-отрицательные спирали. Штамм T05b^T растет при температуре от 6 до 42 °С с оптимумом роста 30 °С. Оптимальное значение рН 9.0, при значении рН ниже 8.0 и выше 11.0 рост не наблюдается. Штамм T05b^T растет при концентрации NaCl от 0 до 14% (вес/об.). Штамм T05b^T использует лактат, формиат, малат, пируват, молекулярный водород, элементную серу, сульфит, тиосульфат и сульфид в качестве донора электронов и нитрат, фумарат, элементную серу, сульфит, тиосульфат, ДМСО, арсенат и кислород в качестве акцептора электронов. Продуктом восстановления нитрата является аммоний. Штамм T05b^T сбраживает малат, пируват, фумарат. В геноме штамма T05b^T содержатся гены, кодирующие ферменты энергетического метаболизма: периплазматический комплекс нитра-

третредуктазы Nap, тиосульфат/полисульфид редуктазу Phs/Psr, сульфид:хинон оксидоредуктазу Sqr и дыхательную арсенатредуктазу Arr.

На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Sulfurospirillum*, как *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov. с типовым штаммом T05b^T (=DSM 112596^T=VKM B-3538^T).

Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00011).

³⁸⁵ ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук.
E-mail: romana2804@gmail.com

³⁸⁶ ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

³⁸⁷ ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

³⁸⁸ ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

³⁸⁹ ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГОРНЫХ ПОРОД ПРИМОРСКОГО КРАЯ И РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

Е.Г. Лебедева³⁹⁰, Р.И. Хисматулина³⁹¹, А.М. Паничев³⁹²

В горных регионах всего мира растительные животные периодически потребляют горные породы. В научной литературе это явление называли геофагия. Животные потребляют минеральные вещества в одних и тех же местах на протяжении десятков лет, что сопровождается формированием характерных природных объектов, хорошо выраженных в ландшафте. По геологической природе такие биоминеральные образования, как правило, представлены глинистыми породами. Изучение природных биоминеральных комплексов как отдельных специфических компонентов природных систем, становится все более актуальным в связи с растущим вниманием к проблемам биогеохимических взаимодействий между живыми организмами и компонентами литосферы. Хорошо известно, что почвы и горные породы населены разнообразными микробными сообществами, которые являются важной составляющей почвенных экосистем и характеризующиеся целым спектром биогеохимических функций. Они играют важную роль в круговороте веществ, почвообразовании и формировании плодородия почв и представлены большим разнообразием форм микроорганизмов. В силу своих малых размеров, они отличаются высоким уровнем метаболизма, могут обладать уникальными свойствами и являться потенциальными продуцентами различных биологически активных веществ: аминокислот, антибиотиков, токсинов, гидролитических ферментов, ауксинов. Изучение гетеротрофных микроорганизмов в горных породах их потенциальной ферментативной активности и физиолого-биохимических особенностей представляет большой практический интерес, так как бактерии и продуцируемые ими БАВ могут найти широкое применение в промышленности. В связи с актуальностью исследования целью работы было изучить биологические свойства культивируемых доминирующих гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из горных пород Приморского края и республики Алтай.

³⁹⁰ ФГБУН «Дальневосточный геологический институт ДВО РАН»

³⁹¹ Дальневосточный Федеральный Университет

³⁹² ФГБУН «Тихоокеанский институт географии ДВО РАН»

Выделение чистых культур гетеротрофных микроорганизмов производили с использованием чашечного метода Коха, после обнаружения роста колоний осуществляли отбор доминирующих культур гетеротрофных микроорганизмов для их последующей идентификации. Биомассу, полученную от единичных колоний, стерильно собирали для проведения молекулярно-генетического анализа гена 16S РНК. Физиолого-биохимические свойства и внеклеточную ферментативную активность микроорганизмов определяли общепринятыми методами. Антибиотическую активность культур продуцентов изучали методом агаровых блоков. В качестве тест-культур использовали музейные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae*, а также культуры мицелиальных фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans* и *Fusarium oxysporum*.

Результаты исследований показали, что среди выделенных гетеротрофных микроорганизмов преобладали непигментированные, подвижные (33,3–70%), грамположительные (63,33 %), каталазоположительные (89,5%) и оксидазоотрицательные (76,3%) палочки (66,7–90%). Выделенные из горных пород Приморского края и Алтая микроорганизмы в большинстве были способны ферментировать углеводы и спирты, что позволяет их отнести к факультативным анаэробам. Глюкоза, например, окислялась около 37,5% исследуемых микроорганизмов, а 68,75% изолятов были способны к ее сбраживанию. Повышенной способностью как к окислению, так и к ферментированию отличались штаммы №42 (*Paenibacillus glucanolyticus*), 83 (*Paenibacillus chibensis*), 103 (*Serratia liquefaciens*) и 152 (*Bacillus thuringiensis*). Наиболее активное разложение ксилоры происходило в результате деятельности штаммов №4 (*Acinetobacter guillouiae*), 42 (*Paenibacillus glucanolyticus*) и 83 (*Paenibacillus chibensis*), эти бактерии показали способность к ее окислению. Дрожжи (№ 83.1) проявляли активность в отношении глюкозы, фруктозы и сахарозы. Штаммы из грунтов Приморского края в наибольшей степени обладали протеолитической, лецитиназной и амилазной активностями. Уреаэную активность проявляли 43,75%, а 25% обладали желатинаразлагающей активностью. При этом, необходимо заметить, что штамм дрожжей (№83.1) (*Rhodotorula mucilaginosa*) не обладали ни одной из этих активностей. Среди штаммов, выделенных из горных пород Алтая, множественной активностью обладали №62 Alt 2.3 (*Bacillus subtilis*), 45 Alt 2.2 (*Streptomyces pratensis*). Средняя активность была замечена у штаммов №18 Alt2.1 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 35 Alt 1.1 (*Paenibacillus terrae*), 14 Alt 2.1 (*Chryseobacterium haifense*) и 46 Alt 2.3 (*Bacillus nakamurai*). Необходимо отметить, что штаммы, выделенные из Приморья, показали большую ферментативную активность, чем штаммы из республики Алтай.

Для исследования антибиотической активности микроорганизмов по отношению к тест штаммам некоторых условно-патогенных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и грибов (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) были взяты 16 штаммов гетеротрофных бактерий, выделенных из горных пород Приморского края и 38 культур гетеротроф-

ных бактерий, выделенных грунтов республики Алтай. Результаты исследования показали, что наибольшую антибиотическую активность проявляли штаммы, выделенные из Алтая. Более активными были культуры №91 Alt 2.5 (*Bacillus tequilensis*), №60 Alt 2.3 (*Bacillus subtilis*), №64 Alt 2.4 (*Bacillus subtilis*), которые подавляли рост большинства исследуемых тест-культур бактерий и грибов. Из Приморского края наиболее активными был штаммы №31 (*Bacillus amyloliquefaciens*), который не проявлял активность только к *Enterococcus faecalis*.

Таким образом, проведенные исследования показали, что выделенные из горных пород штаммы гетеротрофных микроорганизмов способны утилизировать широкий спектр углеводов и спиртов, обладают высокой экзогенной гидролитической активностью и проявляют высокую антибиотическую активность по отношению к фитопатогенным грибам, дрожжам и некоторым условно-патогенным бактериям. Выделенные культуры перспективны для использования в сфере биотехнологии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №20-67-4700578

БИОДЕСТРУКЦИЯ ДИИЗОБУТИЛФТАЛАТА (ДИБФ) И БУТИЛБЕНЗИЛ ФТАЛАТА (ББФ) ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ *TRAMETES HIRSUTA*

А.В. Шабаетв³⁹³, О.С. Савинова³⁹⁴

Актуальность. Эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) – это токсичные соединения, производные фталевой кислоты, используемые для производства различных полимеров, резин, пластмасс, красок и т.д. Широкое применение и одновременно токсичное действие, особенно на эндокринную систему, актуализирует исследования методов биодеструкции фталатов, как наиболее эффективный путь минерализации данных токсинов до безвредных веществ [Clark et al. 2011].

Наиболее перспективным с экологической точки зрения путем обезвреживания ЭФК в окружающей среде считается их биодеструкция с помощью ферментных систем базидиальных грибов [Ястребова и др., 2019]. Однако разработка стратегий, основанных на применении как самих грибных культур, так и синтезируемых ими ферментов, требует четкого понимания механизмов биодеградациии каждого конкретного ксенобиотика, а также обязательной оценки токсичности образуемых метаболитов, так как зачастую продукты деградации ксенобиотиков могут быть более токсичными. В последнее время активно изучаются механизмы биодеструкции ЭФК различными видами грибов белой гнили. На сегодня считается, что ферментативный путь деградации фталатов осуществляется в две фазы: первая фаза включает процесс гидролиза сложного эфира с участием эстераз, в результате чего образуются фталевая кислота и соответствующие спирты; затем бензольные кольца фталевой кислоты и образующиеся при разложении фталевой кислоты и спирта метаболиты расщепляются с участием различных ферментов, таких как декарбоксилазы, дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы, во время второй фазы процесса деструкции. Между тем способность к разложению ЭФК у разных видов грибов различается и обусловлена составом синтезируемого ими ферментного комплекса.

Ранее нами были исследованы несколько видов грибов белой гнили из разных экофизиологических групп и показано, что базидиомицет *Trametes hirsuta* (первичный деструктор разрушающий сапротроф) является перспективным для деградации большинства фталатов, включая такие как ДЭФ (диэтилфталат), ДБФ (дибутилфталат) и ДЭГФ (диэтилгексилфталат) [Савинова и др., 2022].

³⁹³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

³⁹⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Цель работы. В данной работе изучали процесс деградации грибом белой гнили *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 таких фталатов как бутилбензил фталат (ББФ) и диизобутилфталат (ДиБФ), широко применяемых в различных отраслях промышленности [Dutta et al., 2020], в том числе идентифицировали участвующие в данном процессе грибные ферменты и образующиеся при этом метаболиты, с оценкой их токсичности.

Результаты. Грибную культуру (*Trametes hirsuta* LE-BIN 072) культивировали на жидких минеральных средах с добавлением вышеперечисленных фталатов. Ранее нами была установлена наиболее приемлемая концентрация ЭФК в ростовой среде, не приводящая к сильному ингибированию роста грибов, количественно равная 1 г/л, которая использовалась в данной работе [Савинова и др., 2022]. В ходе культивирования проводилось измерение эстеразной и оксидазной активностей методом спектрофотометрии с использованием п-нитрофенил бутирата и АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты диаммониевая соль) в качестве субстратов соответственно. Анализ накопления грибной биомассы показал, что при глубинном культивировании в течение 10 сут. на минеральной среде, содержащей ЭФК, происходит снижение биомассы *T. hirsuta* по сравнению с контрольной средой без фталатов, при этом наибольшее торможение роста гриба отмечено на среде с ББФ. В тоже время показано достоверное повышение общей оксидазной (ОА) и эстеразной (ЭА) активностей в образцах культуральных жидкостей (КЖ) на минеральной среде с фталатами по сравнению с контрольной минеральной средой. Причем высокая (по сравнению с контролем) ЭА характерна на 1-3 сутки культивирования, в то время как максимум ОА отмечен на 6 сутки.

Для оценки степени биодеструкции фталатов применялся метод газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Эффективность биодегградации ЭФК грибом *T. hirsuta* определяли как количество ББФ и ДиБФ по отношению к количеству исходных фталатов. Гриб белой гнили *T. hirsuta* 072 разрушал более 95% исходного ББФ в течение первых суток культивирования, при этом полная деструкция (более 99%) происходила к 3-м суткам культивирования. Что касается ДиБФ, то это соединение разрушалось несколько медленнее – к 10 суткам оставалось около 5% от исходного количества данного фталата в среде.

Для идентификации ферментов, вовлеченных в процесс биодеструкции фталатов, с использованием метода 2D электрофореза с последующей идентификацией белков методом MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрии, было проведено исследование экзопроотеома (секретома) гриба *T. hirsuta* 072 на 10 сут. культивирования. Сравнительный анализ грибных экзопроотеомов показал, что основными секретируемыми на всех средах белками являлись ферменты лигнолитического комплекса гриба, такие как марганец пероксидазы (MnP2, MnP5, MnP7), версатил пероксидаза (VP2), лигнин пероксидаза (LiP9) и лакказа (LacA). Причем при добавлении в ростовую среду разных соединений ЭФК, соотношение лигнолитических ферментов в секретомах изменялось. Так в присутствии ДиБФ среди идентифицированных в секретоме белков увеличивалась доля марганец пероксидазы MnP5 и лигнин пероксидазы LiP9, в то время как доля

MnP2 и MnP7 заметно снижалась. На среде с ББФ – доля марганец пероксидазы MnP7, напротив увеличивалась, в тоже время доля версатил пероксидазы (VP2) значительно снижалась. Содержание лакказы в секретомах с фталатами возрастало, по сравнению с контрольной средой. Обнаруженное нами увеличение количества окислительных ферментов в секретомах с фталатами коррелирует с повышением примерно в 6 раз окислительной активности в этих образцах. Также проводилась идентификация с использованием ГХ-МС и оценка токсичности грибных метаболитов в процессе разрушения фталатов. Оценка токсичности проводилась при помощи экспресс-теста с применением биолюминесцентных штаммов *Escherichia coli* K12 TG1 (pXen7) («Эколум-8», Россия). При добавлении к клеткам *E. coli* ББФ и ДиБФ не происходило угнетения биолюминесценции бактерий. В тоже время КЖ с продуктами деструкции ББФ вызывала значительное снижение интенсивности биолюминесценции, продукты деструкции ББФ, таким образом, могут быть охарактеризованы как сильно токсичные, значительно более токсичные, чем исходно ББФ. Обнаружены различия в профиле грибных метаболитов, что может быть обусловлено отличиями в белковом составе образцов грибных секретомов. Так обнаружено 3 уникальных соединения в образце КЖ с ББФ и 5 – в образце КЖ с ДиБФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00306).

Список литературы:

1. Clark K.E., David R.M., Guinn R., Kramarz K.W., Lampi M.A., Staples C.A. // Hum. Ecol. Risk Assess. (HERA). 2011 V.17. P. 923–965. <https://doi.org/10.1080/10807039.2011.588157>
2. Dutta, S., Haggerty, D.K., Rappolee, D.A., Ruden, D.M., 2020. Phthalate exposure and longterm epigenomic consequences: a review. Front. Genet. 11, 405. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00405>
3. Савинова О.С., Шабает А.В., Глазунова О.А., Еремин С.А., Федорова Т.В. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // Прикладная Биохимия и Микробиология – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 484–499.
4. Ястребова О.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. №4. С. 378–385. <https://doi.org/10.1134/S0555109919040159>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МЕТАГЕНОМИКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРОМА КОЛЛЕКЦИЙ ВИНОГРАДА

Д.А. Швец³⁹⁵, К.А. Сандомирский³⁹⁶,
Е.В. Поротикова³⁹⁷, С.В. Виноградова³⁹⁸

Виноград (*Vitis spp.*) является одной из наиболее широко выращиваемых и экономически важных плодовых культур в мире [1]. В настоящее время на виноградной лозе описано более чем 86 вирусов и вирусоподобных организмов [2]. С распространением технологии высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing (HTS)) стало возможным одновременно получать информацию о всех вредоносных организмах, в том числе вирусах и вироидах, присутствующих в растительном образце. Обнаружение и характеристика известных, а также новых, неописанных ранее патогенов являются примерами наиболее успешного применения этой технологии.

Для анализа виroma и изучение генетического разнообразия вирусов винограда мы проводили фитосанитарный мониторинг и отбор образцов с симптомами заболеваний в Анапской Ампелографической коллекции в России. В результате биоинформатического анализа данных секвенирования тотальных РНК и валидации методами ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени в 47 библиотеках было обнаружено 20 вирусов и 3 вироида. В результате биоинформатического анализа одного из виромов был обнаружен 1 контиг размером 649 н. Blastn анализ его нуклеотидной последовательности с опцией megablast не обнаружил сходство ни с одним вирусом в базе данных Генбанк NCBI. При этом blastn анализ с функцией «Somewhat similar sequences» выявил различный уровень идентичности с представителями семейства *Tombusviridae* (рода *Umbravirus* и *Alphanecrovirus*), а также семейства *Totiviridae* (неклассифицируемый *Totiviridae*). Причем самое высокое сходство (на уровне 68,98%) наблюдалось с нуклеотидной последовательностью предполагаемого гена репликазы изолята Strawberry virus A (StrVA) из рода *Umbravirus*. Blastp анализ аминокислотной последовательности размером 216 aa показал, что близкими являются виды Wheat umbra-like virus (WULV)

³⁹⁵ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина), Москва, Россия

³⁹⁶ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина), Москва, Россия

³⁹⁷ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина), Москва, Россия

³⁹⁸ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина), Москва, Россия

(на уровне 71,36%) и StrVA (на уровне 66,20%). Ни один из вирусов, представленных в роде *Umbravirus*, не поражает виноград. В результате ОТ-ПЦР в 3 образцах были получены ампликоны размером 280 н., секвенирование по Сэнгеру одного из которых показало, что он на 99,5% идентичен последовательности контига, полученного с помощью HTS.

В качестве критериев, определяющих принадлежность изолята к новому виду рода *Umbravirus*, выделяют сходство нуклеотидной последовательности с геномами известных видов вирусов менее чем 70%, а также круг хозяев. В соответствии с этим нами было сделано предположение о наличии нового вируса в анализируемых образцах Grapevine umbra-like virus (GULV).

При анализе виромов образцов Дагестанских коллекций в результате de novo сборки в 3 библиотеках были обнаружены контиги, которые имели сходство с обнаруженной нами ранее последовательностью GULV. Один из них соответствовал почти полному геному представителей рода *Umbravirus*.

По результатам анализа нуклеотидной последовательности изолятов GULV в программе ORF Finder были предсказаны четыре открытые рамки считывания. В результате SDT анализа полных геномов изолятов GULV с видами из рода *Umbravirus* показано, что наибольшее сходство на уровне 56,5% было с геномом WULV. Также, высокое сходство было отмечено с геномами StrVA и Papaya virus Q (PpVQ). Эти результаты были подтверждены филогенетическим анализом. На дендрограмме российские изоляты GULV группируются между собой с бутстреп-поддержкой 100, а также формируют отдельную кладу с представителями рода *Umbravirus*: WULV, PpVQ, StrVA.

Таким образом, в результате анализа виромов коллекций генетических ресурсов винограда был обнаружен новый Grapevine umbra-like virus рода *Umbravirus*.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения №075-15-2022-318 от 20.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего». Работа выполнена на базе ЦКП «Биоинженерия» и УНУ U-73547.

Список литературы:

1. Perrone I. et al. Grapevine–virus–environment interactions: an intriguing puzzle to solve // New Phytologist. – 2017. – Т. 213. – №. 3. – С. 983–987.
2. Fuchs M. Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard // Journal of Plant Pathology. – 2020. – Т. 102. – №. 3. – С. 643–653.

АНАЛИЗ МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ И СИНТЕЗА ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ У ОКСИФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

В.Н. Шелковникова³⁹⁹, М.Е. Дмитриева⁴⁰⁰, А.Ю. Бельшенко⁴⁰¹,
Е.В. Малыгина⁴⁰², М.М. Моргунова⁴⁰³, Н.А. Имидоева⁴⁰⁴,
Т.Ю. Тельнова⁴⁰⁵, А.А.Власова⁴⁰⁶, Д.В. Аксёнов-Грибанов⁴⁰⁷

Рядом современных исследований доказано, что окислительный стресс является главной причиной развития многих заболеваний человека, в том числе снижения репродуктивного потенциала человека. Несмотря на существенное развитие интенсивных и дорогостоящих вспомогательных репродуктивных технологий, методы лечения бесплодия, являются малоэффективными ввиду отсутствия в России лекарственных препаратов с восстановлением репродуктивного потенциала. Таким образом, в настоящее время существует необходимость поиска новых источников антиоксидантов для лечения заболеваний репродуктивной системы.

Экосистема озера Байкал характеризуется высоким процентом эндемичных организмов, низкой концентрацией минеральных солей, низкой температурой воды и экстремально высокой степенью насыщенности воды кислородом. В связи с этим мы предполагаем, что в озере Байкал присутствуют уникальные оксифильные микроорганизмы, которые обладают выраженными механизмами защиты от окислительного стресса, в частности синтезируют природные соединения с высокой антиоксидантной активностью.

Целью данного исследования являлась оценка антиоксидантного потенциала оксифильных микроорганизмов и метабенома микробных сообществ озера Байкал.

Пробоотбор байкальской воды был осуществлён в пос. Большое Голоустное и пос. Бугульдейка (Южный Байкал). В точках пробоотбора была измерена концентрация рас-

творённого кислорода в воде и выбраны зоны с наибольшей концентрацией - 9,97 мг/мл, 10,78 мг/мл, 11,91 мг/мл, и 12,19 мг/мл. Часть воды была профильтрована через бактериальные шприц-фильтры и отправлена в ООО «Биоспарк» для микробиологического профилирования. В результате микробиологических посевов были выделены штаммы оксифильных микроорганизмов, которые в дальнейшем были культивированы в условиях повышенного содержания кислорода в колбах и в условиях холодильной камеры. Далее микроорганизмы были идентифицированы по гену 16S рРНК. Качественную оценку антиоксидантной активности проводили с помощью метода DPPH. Оценка состава природных соединений, синтезируемых микроорганизмами, проводили при помощи подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения и использования базы данных Dictionary of Natural products.

Согласно первичному анализу разнообразия микробных оксифильных сообществ, в образцах, выделенных из зоны с наибольшей концентрацией кислорода, было обнаружено 3 минорные бактериальные филы исключительные для данной зоны. К ним отнесены филы *Armatimonadetes* (OTU, % – 0,04%), *Epsilonbacteraeota* (OTU, % – 0,1%), *Spirochaetes* (OTU, % – 0,02%). Также во всех группах, различных по содержанию кислорода, присутствовала фила *Cyanobacteria* (класс *Oxyphotobacteria*). Стоит отметить, что в образце с повышенным содержанием кислорода содержание таких бактерий было существенно выше (OTU, % – 38%). В образцах, отобранных в зонах более низких концентраций кислорода, *Oxyphotobacteria* являлись минорным классом бактерий (OTU, % – 1–5%). Во всех зонах были обнаружены такие филы, как *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Однако в зоне с более высоким содержанием кислорода найдены отдельные представители родов *Brachy bacterium* (OTU, % – 0,04%), *Porphyromonas* (OTU, % – 0,02%), *Murdochella* (OTU, % – 0,06%), *Bacillus* (OTU, % – 0,04%), *Abiotrophia* (OTU, % – 0,04%), *Peptoniphilus* (OTU, % – 0,02%).

В ходе проведенных работ в настоящее время идентифицировано 9 штаммов микроорганизмов. Среди выделенных микроорганизмов 2 штамма были идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 4 как *Flavobacterium* sp. и 3 как *Janthinobacterium* sp. Примечательно, что штаммы, относящиеся к родам *Janthinobacterium* и *Pseudomonas*, были выделены из образцов воды, отобранных в пос. Б. Голоустное. При этом штаммы рода *Flavobacterium* были выделены из образцов воды, отобранных в пос. Бугульдейка.

В настоящее время проводятся работы по оценке воздействия кислорода на синтез антиоксидантов оксифильных микроорганизмов озера Байкал с применением современных подходов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Нами был показан синтез антиоксидантов N-Acetyl-4-hydroxybenzylamine (ММ - 165,0788 Да) и Arzanol (ММ - 402,1681 Да).

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФМК-1245.2021.1.4.

³⁹⁹ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰⁰ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰¹ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰² Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰³ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰⁴ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰⁵ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰⁶ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

⁴⁰⁷ Иркутский Государственный университет, Иркутск, Россия

ПРОТЕКАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В БИОПЛЕНКАХ ПРИ АНАЭРОБНОМ СБРАЖИВАНИИ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНОКУЛЯТА И ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ МАТЕРИАЛА-НОСИТЕЛЯ

С.В. Шехурдина⁴⁰⁸, Е.А. Журавлева⁴⁰⁹, Ю.В. Литти⁴¹⁰

Активация процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET) в метаногенных микробных сообществах может происходить в разных условиях, в том числе при высокой концентрации летучих жирных кислот. Данная работа является продолжением исследования, посвященного изучению влияния различных материалов, используемых для обеспечения DIET, на анаэробное сбраживание низкоконтентированного свиного навоза. В качестве электропроводящих материалов использовали карбоновый войлок и сетку из нержавеющей стали, а их инертные аналоги были представлены полиэфирным войлоком и сеткой из стекловолокна. Было изучено изменение микробного сообщества осадка сточных вод (SS) и сброженного навоза крупного рогатого скота (СМ) при повышении содержания летучих жирных кислот до сверхвысокой нагрузки 12,5 г/л. Потенциальный выход метана для SS, использованного в качестве инокулята, был наилучшим для флаконов с добавлением карбонового войлока (389,5 мл CH_4) и сетки из нержавеющей стали (402,9 мл CH_4), что на 25 и 29% больше контроля (310,1 мл CH_4). Максимальная скорость образования метана для карбонового войлока (44,2 мл CH_4 /в сутки) и сетки из нержавеющей стали (58,9 мл CH_4 /в сутки) была больше контроля (13,5 мл CH_4 /в сутки), соответственно в 3,3 и 4,4 раза. Скорость удаления ЛЖК была также выше для флаконов с добавлением карбонового войлока и сетки из нержавеющей стали, к 11-му дню степень удаления ацетата, бутирата и пропионата превышала контроль в два раза. Биопленка, образовавшаяся на сетке

из нержавеющей стали была более электроактивна в сравнении с инертным аналогом, а биопленка на карбоновой ткани имела дополнительный окислительный пик, отсутствующий у инертного аналога.

Для флаконов с СМ в качестве инокулята, потенциальный выход метана был лучше у полиэфирного войлока (898,3 мл CH_4) и сетки из нержавеющей стали (882,6 мл CH_4), что на 52 и 50% больше контроля (587,5 мл CH_4). Для сетки из стекловолокна (790,7 мл CH_4) потенциальный выход метана был меньше, чем у полиэфирного войлока и сетки из нержавеющей стали, но больше контроля на 35%. Однако, максимальная скорость образования метана для карбонового войлока (44,7 мл CH_4 /в сутки) и полиэфирного войлока (49,2 мл CH_4 /в сутки) была больше контроля (28,9 мл CH_4 /в сутки) в 1,5 и 1,7 раз. Электроактивность биопленок на нержавеющей стали и сетке из стекловолокна не отличалась, однако электроактивность на биопленке на полиэфирном войлоке была несколько выше, чем на карбоновом.

Основу микробного сообщества биопленок при использовании SS в качестве инокулята на карбоновом и полиэфирном войлоке составляли: предположительно электроактивные микроорганизмы рода *Coprothermobacter* и представители класса *Limnochordia*, а для биопленок на нержавеющей стали доминировали представители рода *Ureibacillus* и класса *Limnochordia*, для сетки из стекловолокна – представители рода *Bacillus* и класса *Limnochordia*. Основу микробного сообщества всех биопленок для СМ составляли предположительно электроактивные представители класса *Limnochordia* MBA03 и рода *Hydrogenispora*; а для биопленок на нержавеющей стали и сетки из стекловолокна представители класса *Limnochordia* MBA03 и рода *Ureibacillus*. Полученные результаты, вероятно, указывают на эффективность протекания не только DIET С типа для SS, но и А и В для СМ, что ранее было отмечено в предыдущей работе.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ «Агротехнологии будущего».

Список литературы:

1. Gahlot, P., Ahmed, B., Tiwari, S. B., Aryal, N., Khursheed, A., Kazmi, A. A., Tyagi, V. K. Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: mechanism and application // Environ. Sci. Technol. 2020. Vol. 20. P. 101056.
2. Xiao, Y., Yang, H., Yang, H., Wang, H., Zheng, D., Liu, Y., Pu, X., Deng, L. Improved biogas production of dry anaerobic digestion of swine manure // Bioresour. Technol. 2019. Vol. 294. P. 122188.

⁴⁰⁸ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия
Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴⁰⁹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия
Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴¹⁰ ФИЦ Биотехнологии РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA MONDAVIORUM*

Е.Г. Шурыгина⁴¹¹, Т.Л. Гордеева⁴¹², С.П. Синеокий⁴¹³

В настоящее время метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* нашли широкое применение в промышленности, в частности в качестве платформы для экспрессии гетерологичных генов, кодирующих различные белки. В данной системе экспрессии были получены более 500 различных белков, включая промышленные ферменты и биофармацевтические препараты. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, кодирующих домены D1/D2 большой субъединицы (26S) рДНК, позволил разделить дрожжи *Pichia pastoris* на семь видов: *Komagataella pastoris*, *K. pseudopastoris*, *K. phaffii*, *K. populi*, *K. ulmi*, *K. kurtzmanii* и *K. mondaviorum*. Чаще всего в промышленности применяются метилотрофные дрожжи *K. pastoris* и *K. phaffii*. Изучение экспрессионного потенциала других видов данного рода является перспективным направлением исследований, так как открывает возможность поиска наиболее эффективных штаммов-реципиентов для промышленного использования.

Целью настоящей работы являлось сравнение экспрессионного потенциала различных штаммов метилотрофных дрожжей *K. mondaviorum* для получения рекомбинантных белков.

В ходе исследования был проведен скрининг штаммов *K. mondaviorum* из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) на предмет способности осуществлять экспрессию гетерологичных генов с высокой эффективностью. В качестве контрольных штаммов-реципиентов использовали коммерческие штаммы *K. phaffii* X-33 и *K. phaffii* GS115. Экспрессионный потенциал штаммов определяли по величине продуктивности полученных трансформантов. В качестве репортерного гена был выбран ген, кодирующий α -амилазу *RmAmyA* из *Rhizomucor miehei*, так как ранее было показано, что он эффективно экспрессируется в *K. phaffii*. Ген был оптимизирован по кодоновому составу, синтезирован и клонирован в вектор pPIC9K под контролем индуцибельного промотора

алкогольоксидазы I (AOX1). Для секреции фермента было предусмотрено наличие сигнального пептида α -фактора дрожжей *S. cerevisiae*, для селекции трансформантов – ген *kanR*, обеспечивающий устойчивость трансформантов к антибиотику G418.

В результате трансформации полученной интегративной экспрессионной кассеты в различные штаммы *K. mondaviorum*, а также *K. phaffii* X-33 и *K. phaffii* GS115 были произвольно отобраны по 10 трансформантов. Культивирование проводили в полной среде YP (1% пептон, 1% дрожжевой экстракт) в течение 72 часов с индукцией 1% метанолом каждые 24 часа. Активность амилазы в КЖ оценивалась по количеству восстанавливающих сахаров с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС). За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин при оптимальных условиях работы фермента.

По результатам измерения продуктивности был определен наиболее эффективный штамм-реципиент *K. mondaviorum* Y-4330. Средняя продуктивность трансформантов, полученных на основе отобранного штамма, превышала таковую для трансформантов штаммов *K. phaffii* X-33 и GS115 в 1,35 и 2,08 раза соответственно.

Изучение ростовых характеристик *K. mondaviorum* Y-4330 и контрольных штаммов показало, что отобранный штамм обладает более высокой скоростью накопления биомассы.

Таким образом, был выбран наиболее эффективный штамм-реципиент *K. mondaviorum* Y-4330, обладающий высоким экспрессионным потенциалом, отличающийся высокой скоростью роста, а также способностью к накоплению большого количества биомассы.

Работа выполнена с использованием уникальной научной установки - Биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (БРЦ ВКПМ).

⁴¹¹ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

⁴¹² НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

⁴¹³ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ЭВКАЛИПТА (EUCALYPTI VIMINALIS FOLIA) НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ *PESTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

А.В. Яшников⁴¹⁴, О.В. Доманская⁴¹⁵, Е.В. Гурина⁴¹⁶, А.С. Васильченко⁴¹⁷

Актуальность. *Pectobacterium carotovorum* фитопатоген, вызывающий серьезные заболевания у сельскохозяйственных и декоративных культур растений, преимущественно у пасленовых, вызывая черную ножку и мягкую гниль картофеля (Горшков В. Ю., 2017). Один из подходов борьбы с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами связан с воздействием через межклеточную коммуникацию микроорганизмов quorum sensing (QS) на их вирулентность. Растения синтезируют множество веществ с потенциальным анти-QS действием, что ранее мы показали на примере экстракта из коры дуба (Vasilchenko et al. 2022).

Данная работа посвящена исследованию растительного экстракта эвкалипта *Eucalypti viminalis folia*, как препарата, снижающего вирулентность *P. carotovorum* VKM-B-1247.

Материалы и методы. Для получения экстракта использовали фармакологический препарат измельченных листьев эвкалипта (рег. № ЛСР-000609/08; «Фармацвет», Россия). Экстракт получали экстрагированием этиловым спиртом (70 %). Для определения анти-QS активности экстракта использовали биосенсорный штамм *S. violaceum* CV 31532. Изменения в вирулентности *P. carotovorum* определяли по их целлюлозной и протеазой активностям.

Оценку анти-QS свойств экстракта в опытах *ex vivo* проводили на срезах клубней картофеля, обработанных исследуемым препаратом, по развитию симптомов мягкой гнили.

Результаты. Тестируемый нами экстракт обладал анти-QS эффектом, что было зафиксировано с помощью *S. violaceum* CV 31532.

⁴¹⁴ Лаборатория антимикробной резистентности, Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁴¹⁵ Лаборатория антимикробной резистентности, Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁴¹⁶ Лаборатория антимикробной резистентности, Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁴¹⁷ Лаборатория антимикробной резистентности, Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

На втором этапе работы была проведена оценка антимикробного эффекта экстракта на рост *P. carotovorum*. Ингибирования роста клеток при исследуемых концентрациях (1, 0,5 и 0,25 мг/мл) обнаружено не было.

При воздействии экстракта на пектобактерию снижалась ферментативная активность. Так целлюлозная активность была ниже на 75 % в образце с концентрацией 1 мг/мл по сравнению с контролем, на 38 % в образце с концентрацией 0,5 мг/мл и на 5 %–0,25 мг/мл. Аналогичный результат получился с протеазной активностью. Концентрация 1 мг/мл снижала активность на 80 %, 0,5 мг/мл на 50 %, 0,25 мг/мл – 10 % (рис. 1).

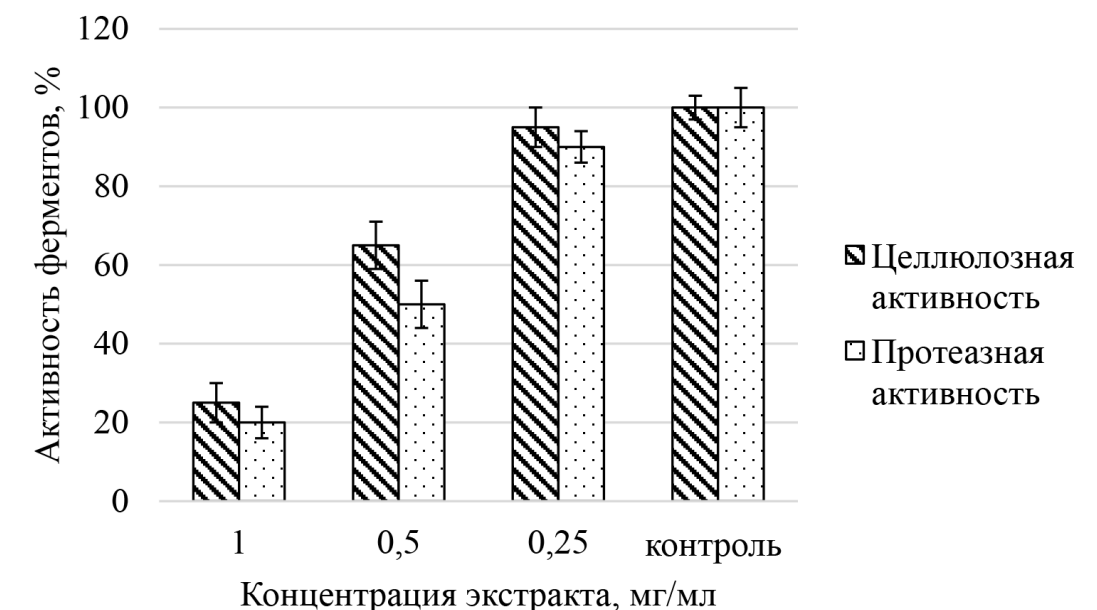


Рис. 1. Влияние экстракта эвкалипта на ферментативную активность *P. carotovorum*. Данные показаны как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$)

В опыте *ex vivo*, при обработке картофеля экстрактом, была показана устойчивость картофеля к проявлению мягкой гнили при заражении пектобактерией. При снижении концентрации экстракта, снижался защитный эффект. Так в контроле симптомы гнили присутствовали на 51 % от всей площади, при обработке экстрактом в концентрации 1 мг/мл симптомы гнили отсутствовали, при концентрации 0,5 мг/мл было поражено 12 %, при 0,25 мг/мл – 45 %.

Заключение. Таким образом, показано, что экстракт эвкалипта обладает антивирулентными свойствами в отношении фитопатогенного штамма *P. carotovorum* предположительно за счет вмешательства в функционирование системы QS.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение №075-15-2021-1345, уникальный идентификатор RF----193021X0012).

Список литературы:

1. Горшков В. Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем. — Казань: Изд-во Сергея Бузукина, 2017 — 304 с.
2. Vasilchenko, A.S., Poshvina, D.V., Sidorov, R.Y., Iashnikov, A.V., Rogozhin, E.A., Vasilchenko, A.V. Oak bark (*Quercus* sp. cortex) protects plants through the inhibition of quorum sensing mediated virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(11), 184.

Научное издание

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

XIII молодежная школа-конференция с международным участием.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г.

Дизайн обложки А. Берникова

Верстка Е. Игнатьева

Сдано в набор 14.10.2022 г. Формат 60х90/16.

Печать офсетная. Тираж 100 экз. Бумага офсетная.

Подписано в печать 03.11.2022 г. Заказ 8754.

Отпечатано в типографии «ВАШ ФОРМАТ»

г. Москва, ул. Донская, 32.

+7 (495) 749-45-84

www.kniga-premium.ru

