

# АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

XIV молодежная школа-конференция с международным участием.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 6–8 ноября 2024 г.

Москва,  
2024

УДК 579(082)  
ББК 28.4я43  
А43



#### СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:



#### Программный комитет:

*В.О. Попов*, академик РАН – сопредседатель; *Н.В. Пименов*, д.б.н. – сопредседатель;  
*Е.А. Бонч-Осмоловская*, член-корр. РАН – сопредседатель; *В.Г. Дебабов*, академик РАН;  
*А.Н. Федоров*, д.б.н.; *Н.В. Равин*, д.б.н.; *М.В. Донова*, д.б.н.; *С.Н. Дедыш*, д.б.н.;  
*В.А. Щербакова*, д.б.н.; *А.В. Марданов*, д.б.н.; *А.Л. Степанов*, д.б.н.

#### Организационный комитет:

*Н.В. Пименов*, д.б.н. – председатель; *Н.В. Равин*, д.б.н.; *А.М. Камионская*, к.б.н.; *С.Н. Дедыш*, д.б.н.;  
*В.В. Миронов*, д.т.н.; *И.С. Мысякина*, д.б.н.; *А.В. Марданов*, д.б.н.; *Т.В. Хижняк*, д.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.;  
*Е.В. Груздев*, к.б.н.; *А.В. Пелевина*, к.б.н.; *А.А. Фролова* – секретарь конференции

**А43** **Актуальные аспекты современной микробиологии: XIV молодежная школа-конференция с международным участием.** Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 6–8 ноября 2024 г. – М. : ВАШ ФОРМАТ, 2024. – 216 с.

ISBN 978-5-00147-678-8

ISBN 978-5-00147-678-8



9 785001 476788

УДК 579(082)  
ББК 28.4я43

© Коллектив авторов, 2024

© Институт микробиологии им. Н.С. Виноградского, 2024

# СОДЕРЖАНИЕ

А.В. Аконджанян, Т.А. Панкратов Исследование влияния 4-гексилрезорцина и усниновой кислоты на активность доксицилина, энрофлоксацина и микафунгина в отношении модельных микроорганизмов <i>in vitro</i> .....	10
В.М. Андреевская, С.Н. Еланский, М.А. Севостьянов, У.В. Ерёмкина Взаимодействие бактерий филлосферы с фитопатогенами пасленовых.....	13
А.С. Артемченко, Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова Стабилизация биопрепаратов вторичными метаболитами бактерий микробиоты кишечника насекомых.....	17
А.Н. Асташонок, Н.В. Яцкевич, А.Л. Иванова, Т.Ю. Степук Использование сенсорных покрытий на биочипах для изучения цитеоархитектоники <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	19
Д.И. Батуев, М.В. Семенов, А.М. Семенов Молекулярно биологическая и микробиологическая характеристика микробных сообществ почвенных экосистем, подвергающихся олгитрофикации для разработки способов управления микробными сообществами их трофикой.....	22
К.Я. Башикирова, А.А. Ермолюк, О.Б. Воробьева, М.В. Шитов, Л.А. Александрова, А.Р. Хомутов, В.А. Макаров, А.А. Жгун, Д.А. Авданина Молекулярная диагностика микробиологического состояния иконы «деисусный чин на одной доске (13 фигур)» из Государственной Третьяковской галереи и подбор антисептиков для ее защиты.....	25
Ю.С. Беляева, Е.А. Воробьева, О.Г. Орлова Перспективы применения штамма <i>L. Plantarum</i> 8РА-3 для лечения и профилактики инфекций, вызванных <i>S. Aureus</i> .....	28
Е.Е. Бенько, А.А. Ермолюк, Л.А. Александрова, Д.А. Макаров, М.В. Ясько, Д.А. Авданина, А.А. Жгун Выбор тест-культур для определения механизма действия модифицированных алкилнуклеозидов, перспективных антисептиков для защиты произведений живописи.....	30
А.С. Бобко, А.В. Локтева Влияние мезоэкосистем на антимикробную активность микробиоты эпилитного лишайника <i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach. ....	33
Е.А. Богданов, М.А. Демидова, А.Э. Вишняков, О.Н. Котенко, А.Н. Островский Скрытое разнообразие. Обзор симбиотических ассоциаций прокариот с мшанками (Vryozoa).....	36

Д.В. Бубнова, С.В. Калёнов Совместное культивирование экстремально галофильных архей и бактерий .....	38
О.А. Галуза, Г.И. Эль-регистан, Н.А. Коротков, Ю.А. Николаев Разработка биопрепаратов молочнокислых бактерий с длительным сроком хранения на основе гелей .....	41
Е.Р. Гончарова, М.С. Самарина, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, Е.И. Ермолова, Т.И. Карпова, Е.А. Климова, И.С. Тартаковский, О.Л. Воронина Изменение спектра генотипов клинических изолятов <i>L. Monocytogenes</i> как отражение трендов в пищевой индустрии.....	44
А.С. Гордеев, Л.Р. Бикташева, А.А. Кириченко Выделение микроорганизмов-продуцентов биосурфактантов из органических отходов.....	47
Д.Е. Гуляева, А.В. Сидоренко Биотехнологический потенциал штамма <i>Roseateles amylovorans</i> bsSlp3-1 <sup>+</sup> : фенотипический и геномный анализ.....	50
С.С. Гусев, Е.В. Сорокина, Л.Ф. Ткебучава Анализ природных вод, в том числе используемых в качестве источников нецентрализованного водоснабжения населения, с использованием методов биотестирования на примере верхневолжского бассейна.....	53
Д.Ю. Данилова, К.В. Кантор, А.В. Сидоренко Мицелиальные и дрожжевые грибы, вызывающие порчу молочных продуктов: разнообразие и устойчивость к факторам внешней среды.....	56
Ю.А. Дорченкова, А.А. Белов, В.С. Чепцов, Т.А. Грачева, А.Л. Степанов, А.В. Александрова Актиномицетные комплексы почв и сопряженных субстратов природных заповедников Вьетнама (Батдайшон, Суанлиен, Тэйзьянг).....	59
П.С. Дудик, Д.К. Армянинова Пробиотический штамм <i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37 как платформа для создания вакцинных препаратов .....	61
А.А. Дудун, А.П. Бонарцев, Г.А. Бонарцева <i>Azotobacter vinelandii</i> 12 как потенциальный продуцент высокомолекулярного альгината для биомедицины и биотехнологий .....	63
А.М. Дукат, А.Г. Ельченинов, Е.Н. Фролов Термофильные сероокисляющие бактерии кальдеры узон.....	66
А.М. Дюбарь, А.В. Артыкова, Ю.А. Елкина, А.В. Колосов, В.С. Меламуд, А.В. Нечаева, А.В. Марданов, А.Г. Булаев Биоокисление упорного золотосодержащего концентрата в неблагоприятных условиях .....	69

Е.В. Дювенжи, Е.Д. Неволлина, С.В. Мартьянов, М.В. Журина, А.В. Козлов, В.К. Плакунов, А.В. Ганнесен Факторы гуморальной регуляции человека как молекулы-модификаторы активности антибактериальных веществ в отношении моновидовых и бинарных биопленок <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Kytococcus schroeteri</i> .....	73
А.С. Еланский, Д. Симбо, С.Н. Еланский, Е.Н. Пакина, Е.М. Чудинова Микобиота клубней картофеля и плодов томата, выращенных в Мали .....	75
А.А. Елистратова, Т.М. Ивойлова, Т.В. Ширишкова, М.И. Маркелова, М.Р. Шарипова, И.В. Хиляс Биосинтетические генные кластеры биосинтеза сидерофоров эндолитного штамма <i>Bacillus velezensis</i> S18.....	78
К.В. Ермакова, В.Ю. Ушаков, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский Динамика низкомолекулярных серусодержащих соединений у бактерий <i>Bacillus megaterium</i> при действии антибиотиков .....	81
А.А. Ермолюк, Ф.С. Коблов, Д.А. Авданина, С.Г. Калинин, Б.Ф. Васильева, М.В. Демьянкова, О.В. Ефременова, А.А. Жгун Определение антимикробной активности у грибов-деструкторов темперной живописи, изолированных в Государственной Третьяковской галерее .....	84
Н.С. Жуланова, А.В. Тюленев, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский Изменение уровней глутатиона у штаммов <i>Escherichia coli</i> с множественной антибиотикоустойчивостью при действии канамицина .....	86
Е.А. Журавлева, А.А. Лайкова, А.А. Ковалев, Д.А. Ковалев, С.В. Шехурдина, Н.Г. Лойко, Е.А. Андреев, А.А. Иваненко, Ю.В. Литти Биотехнологический потенциал углеродного войлока для стимуляции прямого межвидового переноса электронов при анаэробном сбраживании сточной воды свинофермы в непрерывных условиях.....	88
С.П. Зимич, Г.И. Булавко, А.П. Яковлев Активность азотфиксации в ризосфере <i>Vaccinium corymbosum</i> L., возделываемой на выработанных торфяниках в эксперименте с удобрениями.....	91
Е.В. Зубова, Е.Р. Гафарова, Д.С. Курячий, Е.Арепкин, А.И. Гранович Воздействие трематоды <i>Microphallus rugtaeius</i> на голобионта.....	94
А.В. Игнатенко, Т.В. Хижняк Новый галоалкалофильный штамм <i>Salisediminibacterium</i> MB1000, способный эффективно восстанавливать хромат .....	96
Н.А. Имидоева, Е.В. Малыгина, А.Ю. Бельшенко, М.Е. Дмитриева, Т.Н. Вавилина, Д.В. Аксёнов-Грибанов Исследование эффективности механической и биологической обработки для высвобождения спор <i>Tuber aestivum</i> .....	99

С.Г. Калинин, М.В. Думина TsA <i>Thermococcus sibiricus</i> как пример перспективного биокатализатора экстремофильного происхождения для пищевой промышленности .....	101
К.В. Кантор, А.В. Сидоренко Идентификация и физиологические особенности дрожжей, выделенных из обитаемой среды российского сегмента международной космической станции.....	104
Н.И. Кириллова, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин Выделение и идентификация гетеротрофных нитрифицирующих бактерий активного ила .....	106
С.В. Клементьев, Ю.В. Куликова, А.С. Сироткин Характеристика микробных изолятов в процессе обезвреживания водной фазы гидротермального ожигения биомассы активного ила.....	108
Т. Н. Клементьева, О. В. Поленогова, Н.А. Крюкова, В.В. Глухов Роль кишечных бактерий насекомых в изменении чувствительности хозяина к энтомопатогенам.....	111
Г.С. Ключин, С.Н. Гаврилов Роль экстремофильных электроактивных микроорганизмов в процессах биоминерализации железа .....	113
Ф.С. Коблов, А.А. Ермолюк, Д.А. Авданина, С.Г. Калинин, Б.Ф. Васильева, М.В. Демьянкова, О.В. Ефременова, А.А. Жгун Оптимизация культивирования <i>Penicillium chrysogenum</i> STG-344 для эффективной продукции высокоактивных противомикробных препаратов .....	116
А.М. Козырева, С.Н. Еланский, Л.Ю. Кокаева Грибные патогены цикория: видовое разнообразие и восприимчивость к фунгицидам.....	119
А.В. Кондратьева-Гринь, Л.А. Поздняков, А.Р. Лавренов, В.С. Румак Почвенные микробные сообщества под воздействием загрязнения диоксинами на территории, прилегающей к полигону твердых коммунальных отходов «Саларьево» .....	122
А.И. Косякова, О.С. Самылина, О.И. Габышева, В.А. Габышев, В.В. Кадников, А.В. Белецкий, Н.В. Пименов Первые данные о филогенетическом разнообразии микробных сообществ термокарстовых озер центральной Якутии .....	125
А.С. Кузнецов, А.В. Моисеенко, Д.С. Матюшкина, А.В. Летаров Потенциальные роли белков gr84, gr61 и gr47 в инфекционном процессе бактериофага φ24b .....	128
Э.О. Ладнов, П.А. Зайцев, Б.М. Шурыгин, А.Е. Соловченко Функциональное профилирование микробных сообществ по результатам метагеномного секвенирования на платформе третьего поколения.....	130

А.А. Лайкова, А.А. Ковалев, Д.А.Ковалев, Е.А. Журавлева, С.В. Шехурдина, А.А. Иваненко, Ю.В. Литти Оптимизация режима предварительной обработки органического субстрата в аппарате вихревого слоя для повышения энергетического выхода анаэробного сбраживания.....	132
А.М. Лендел, Н.П. Антонова, Е.В. Усачёв, Д.В. Васина Особенности антибактериальной активности двух лизинов бактериофага <i>Raoutella</i> spp .....	135
Е.В. Малыгина, Н.А. Имидоева, Н.С. Потапова, Т.Н. Вавилина, А.Ю. Бельищенко, А.А. Баталова, В.М. Жиленков, М.М. Моргунова, Д.В. Аксёнов-Грибанов Метагеномное профилирование прокариот, населяющих различные части черного трюфеля <i>Tuber macrosporium</i> .....	137
С.В. Мартьянов, Е.В. Дювенжи, Е.Л. Здоровенко, Р.Х. Зиганьшин, М.И. Щелкунов, В.М. Терешина, Е.А. Януцевич, О.А. Данилова, Е.Д. Неволина, А.М. Мосолова, Н.А. Логинова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, А.В. Ганнесен Некоторые аспекты влияния гормонов человека – эстрадиола, адреналина, норадреналина, натрийуретического пептида типа А – на рост биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека .....	139
С.С. Махортых, Я.В. Рыжманова, В.А. Щербакова Новые анаэробные термофильные бактерии, выделенные из донных осадков Охотского моря .....	142
А.Д. Мельник, А.Р. Строева, А.Ю. Меркель Поиск признаков синтрофного образа жизни в геномах сульфатредукторов донных отложений Арктических морей.....	145
О.И. Мельников, О.Н. Розова, В.Н. Хмеленина Осмоадаптация галотолерантного метилотрофа <i>Methylobrevis ramukkalensis</i> PK2.....	149
К.П. Меркель Дрожжевое население разных онтогенетических групп муравьев вида <i>Formica aquilonia</i> .....	152
Л.Д.Н. Муршеди, И.П. Соляникова Оценка антибактериальной эффективности наночастиц серебра, полученных с использованием <i>Solanum melongena</i> L. ....	155
Н.И. Наумович, В.И. Пригодская Влияние техногенного засоления на микробиоту почвы .....	157
А.И. Нечаева, В.Ю. Сенченков, И.П. Соляникова Оценка влияния сложнорастворимых загрязнителей на почву .....	160
Е.А. Образцова, Е.В. Сорокина Сравнительный анализ действия наночастиц разного состава на биологические системы штамма <i>Escherichia coli</i> .....	163

А.В. Пелевина, А.Г. Дорофеев, Е.В. Груздев, А.В. Марданов, Н.В. Пименов Влияние нитрата и нитрита на анаэробное поглощение фосфора фосфат-аккумулирующими микроорганизмами лабораторного биореактора .....	166
В.А. Пихтерева, А.А. Клюкина, А.Ю. Меркель, Д.Г. Заварзина Таксономический и функциональный состав анаэробных микробных сообществ лечебных грязей озера Тамбукан .....	168
В.А. Платонов, С.Н. Еланский, Е.М. Чудинова Пектолитические бактерии рода <i>Pseudomonas</i> из поражённых клубней картофеля, выращенных на Камчатке.....	171
О.В. Поленогова, Т.Н. Клементьева, А.С. Артемченко, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов Трансформация биологических свойств бактерий как новый подход к селекции микроорганизмов при создании биопрепаратов для защиты растений .....	173
М.В. Романова, Н.А. Мирзалиева, А.В. Белодед Перспективы применения комплексного сырья для получения маннааз термофильных бактерий.....	175
В.И. Сагидуллина, А.В. Ахова, А.Г. Ткаченко Применение клеток <i>Escherichia coli</i> в качестве биокатализатора конверсии l-лизина в 1,5-диаминопентан.....	177
Д.А. Суворов, М.В. Романова, Л.Л. Вакар, А.Е. Кузнецов Влияние РО-воздействия на динамику изменения общей дегидрогеназной активности клеток активного ила в процессе аэробной очистки сточных вод .....	180
А.Б. Третьякова Генетические характеристики при моделировании процессов влияния инсектицидов неоникотиноидного ряда на <i>Apis mellifera</i> .....	183
А.С. Туленков, А.Г. Ельченинов, Д.Ю. Сорокин Анализ геномов новых представителей натриноархей рода <i>Natrarchaeobius</i> .....	185
М.В. Тюрин, Л.Ф. Ашмарина, Т.А. Садохина, Д.Ю. Бакшаев, В.П. Данилов, В.В. Глупов Эндофитные организмы как основа современных биопрепаратов в растениеводстве .....	189
В.Н. Усова, А.В. Вишнякова, Т.В. Колганова, Н.М. Попова, А.В. Сафонов, Ю.В. Литти Моделирование <i>in situ</i> очистки пластовой воды от соединений азота с использованием ключевых процессов окислительного и восстановительного ветвей цикла азота .....	191
А.С. Филиппова, А.Н. Осина, И.А. Нечаева Характеристика биосурфактантов <i>Gordonia amicalis</i> G2 .....	194

---

А.А. Фролова, А.Ю. Меркель, Д.С. Копицын, А.И. Слободкин <i>Petrocella pelophila</i> sp. nov. – новая факультативно анаэробная, алкалифильная бактерия из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова .....	197
М.С. Харченко, В.С. Скрипникова, Ю.Г. Ростова, Н.П. Закатаева Регуляция экспрессии гена глутаматдегидрогеназы у <i>Rantoea ananatis</i> .....	199
А.А. Хасанова, А.С. Сироткин Анализ процесса биологической дефосфатации сточных вод иммобилизованной биомассой микробного сообщества активного ила.....	202
М.И. Чос, А.Г. Ельченинов, К.С. Заюлина Гидролитический потенциал гипертермофильной археи, принадлежащей к новому виду рода <i>Thermosphaera</i> .....	205
С.В. Шехурдина, Е.А. Журавлева, А.А. Лайкова, А.А. Ковалев, Д.А. Ковалев, А.А. Иваненко, Н.Г. Лойко, Ю.В. Литти Сравнение эффективности электропроводящих и неэлектропроводящих материалов в стимулировании прямого межвидового переноса электронов при анаэробном сбраживании .....	207
Ф.В. Ширишков Применение алгоритмов <i>Morphocatcher</i> в дифференциальной диагностике бактериальных и вирусных патогенов.....	210
М.М. Ярмеева, А.Ф. Белосохов, Е.М. Чудинова, С.Н. Еланский Виды комплекса <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> на культивируемых пасленовых растениях в России .....	213

# ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА И УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ДОКСИЦИКЛИНА, ЭНРОФЛОКСАЦИНА И МИКАФУНГИНА В ОТНОШЕНИИ МОДЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ IN VITRO

А.В. Акопджанян<sup>1,2</sup>, Т.А. Панкратов<sup>3</sup>

На сегодняшний день антибиотики (АБ) не только спасли миллионы жизней, но и стали необходимыми инструментами в проведении стандартных медицинских процедур: общая хирургия, химиотерапия, трансплантация и так далее. Эти препараты стали не менее важным инструментом и в животноводстве, повышая продуктивность хозяйств. Содержание животных в ограниченных пространствах создает опасность быстрого распространения инфекции, поэтому противомикробные препараты стали повсеместно применяться не только для лечения болезней, но и их профилактики, что в свою очередь приводит к не менее опасной угрозе – антибиотико-резистентности (АБР).

Решить проблему АБР возможно несколькими путями:

1. Поиск новых биоцидных агентов;
2. Комбинирование нескольких АБ с различными механизмами действия;
3. Использование бинарных композиций АБ с адьювантами (вещества – усиливающие их действие).

Поиск новых АБ, приводящий к появлению новых антимикробных соединений, не является магистральным направлением, так как устойчивость к любому из известных АБ появляется и распространяется в течение довольно короткого периода времени. Использование комбинаций двух антибиотиков замедляет формирование АБР, но не решает проблему, а многокомпонентные антимикробные препараты составляют малую часть рынка. Использование высоких доз антибиотиков нередко приводит

---

<sup>1</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

к смертности животных и снижает их продуктивность, антибиотики накапливаются в продуктах животного происхождения и далее могут негативно влиять на потребителя. В связи с этим появляется необходимость применения антибиотиков в более низких концентрациях, сублетальных для патогенных микроорганизмов. При этом, в сочетании с другими соединениями, которые не рассматриваются как традиционные антибиотики, а выполняют функцию адъювантов – веществ, усиливающих действие антибиотиков, активность антибиотиков многократно усиливается.

Создание комплексных препаратов, содержащих пониженные концентрации классических антибиотиков и адъюванты, является перспективным направлением ветеринарной биохимии и биотехнологии. Такие разработки проводятся во многих лабораториях и являются актуальными. Перспективными адъювантами для проверки бинарных систем являются 4-гексилрезорцин (ГР) и усниновая кислота (УК).

Целью работы является определение оптимальных композиций антибактериальных препаратов (доксциклин, энрофлоксацин, флорфеникол, микафунгин) и адъювантов (4-гексилрезорцин, усниновая кислота) к тестовым условно-патогенным культурам (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida parapsilosis*).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение минимально ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков с различающимся типом бактерицидной активности (доксциклин (ДЦ), энрофлоксацин (ЭФ), флорфеникол (ФФ)), замещенных фенолов (4-гексилрезорцин) и лишайниковых кислот (усниновая кислота) для подавления роста условно-патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*;
2. Определение минимально ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика, обладающего фунгицидной активностью (микафунгин), замещенных фенолов (4-гексилрезорцин) и лишайниковых кислот (усниновая кислота) для эффективного подавления роста условно-патогенных дрожжей *Candida parapsilosis*;
3. Определение эффективности подавления роста тест-культур различными композициями вышеуказанных антибиотиков и адъювантов.

После определения минимально ингибирующих концентраций исходных соединений по отношению к тестовым культурам, была составлена схема эксперимента (табл. 1). Композиции АБ и АД, содержащие по 1 МИК биоцидных веществ, последовательно разбавляли вместе с аликвотами условно-патогенных микроорганизмов для последующего определения роста методом по конечной точке (измерение начального и конечного значения оптической плотности).

В результате был получен массив данных, с помощью которого была проанализирована эффективность композиций адъювантов и антибиотиков по отношению к следующим микроорганизмам: грамположительному *S. aureus*, грамотрицательному *P. aeruginosa* и к дрожжам *C. parapsilosis*. Наибольшее бактериостатическое действие на *S. aureus* оказало сочетание УК и ЭФ, при котором были снижены концентрации действующих веществ в 8 раз, при этом сохранялся эффект от 1 МИК. Следующим

Таблица 1.

Схема эксперимента с применением композиций АБ и АД. 1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. parapsilosis*. Концентрации АБ и АД указаны в мкг/мл

АБ и АД	1 МИК			0.5 МИК			0.25 МИК			0.125 МИК			0.0625 МИК		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ГР	80	200	19	40	100	9.5	20	50	4.75	10	25	2.375	5	12.5	1.188
УК	1	>200	180	0.5	-	90	0.25	-	45	0.125	-	22.5	0.0625	-	11.25
ЭФ	3	6	-	1.5	3	-	0.75	1.5	-	0.375	0.75	-	0.188	0.375	-
ДЦ	0.05	50	-	0.025	25	-	0.0125	12.5	-	0.00625	6.25	-	0.0031	3.125	-
ФФ	18	600	-	9	300	-	4.5	150	-	2.25	75	-	1.125	37.5	-
МФ	-	-	1	-	-	0.5	-	-	0.25	-	-	0.125	-	-	0.0625

по эффективности оказались сочетания ГР/ЭФ и УК/ФФ, с помощью которых снижение концентрации АБ и АД было четырёхкратным при схожих показаниях одной МИК. Композиция ГР и ФФ смогла продемонстрировать лишь слабый бактериостатический эффект при уменьшении их концентраций в два раза по сравнению с МИК. Синергидного действия вовсе не наблюдалось при применении сочетаний ГР/ДЦ и УК/ДЦ. Из-за слишком высокой МИК УК по отношению к *P. aeruginosa* были изучены композиции АБ только с гексилрезорцином. Значительного изменения концентраций АБ и АД, бинары не продемонстрировали. При концентрации 1/2 от МИК сочетания ГР/ЭФ и ГР/ФФ проявили малый бактериостатический эффект. Для дрожжей *C. parapsilosis* наиболее эффективным оказалось сочетание МФ с УК, при котором удалось уменьшить величину МИК для антибиотических агентов в два раза. ГР вместе с МФ не проявили достаточно сильного антимикробного действия.

Данные о композициях могут быть использованы во многих отраслях медицины, сельского хозяйства, фармакологической индустрии. В частности, в ветеринарии есть тенденция использования антибиотиков не только в качестве лекарства, но и в качестве профилактического средства, что приводит к эффективному образованию антибиотикорезистентных штаммов. Проблема АБР становится все большей угрозой в последние десятилетия, именно поэтому снижение использования АБ в животноводстве особенно важно. В этой сфере и пригодятся данные о композициях с АД, которые уменьшат концентрации АБ, сохранив эффективность при лечении и профилактики заболеваний.

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ ФИЛЛОСФЕРЫ С ФИТОПАТОГЕНАМИ ПАСЛЕНОВЫХ

В.М. Андреевская<sup>4, 5</sup>, С.Н. Еланский<sup>6</sup>,  
М.А. Севостьянов<sup>7</sup>, У.В. Ерёмина<sup>8, 9</sup>

## Введение

Использование химических пестицидов приводит к загрязнению окружающей среды и продукции. Одно из возможных решений уменьшения пестицидной нагрузки на окружающую среду – биологизация сельского хозяйства, которая предполагает активное использование биологических средств защиты растений (БСЗР). К настоящему времени спектр используемых в БСЗР видов и штаммов микроорганизмов сильно ограничен, в связи с чем необходим поиск новых перспективных агентов биоконтроля [1].

В настоящее время в БСЗР используются штаммы бактериальных антагонистов, таких как *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* [2]. Имеются сведения о подавлении *Pseudomonas aeruginosa* роста *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* и *Alternaria solani* [3]. Отмечена эффективность *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca* против *Fusarium graminearum* [4]. Микробиологические агенты биоконтроля активно конкурируют с фитопатогенами, так как используют те же источники энергии, микроэлементы и экологические ниши, что предотвращает закрепление последних на культивируемых растениях и в почве под ними [3]. Использование агентов биологического контроля позволяет бороться с болезнями растений и поддерживать устойчивость агроценоза.

## Материалы и методы

Штаммы бактерий были выделены с поверхности здоровых листьев картофеля, томата и перца в Орловской и Московской областях и Республике Коми в 2023 году. Выделение чистой культуры проходило с помощью отпечатка на питательную среду ГРАУ [5], после чего чашки Петри культивировались в термостате при 24 °С до появле-

<sup>4</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ ВНИИ Фитопатологии, Большие Вяземы, Россия

<sup>6</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>7</sup> ФГБНУ ВНИИ Фитопатологии, Большие Вяземы, Россия

<sup>8</sup> ФГБНУ ВНИИ Фитопатологии, Большие Вяземы, Россия

<sup>9</sup> РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева

ния первых колоний. Появившиеся колонии пересеивались на новую чашку Петри с той же питательной средой.

Для оценки видовой принадлежности использовали анализ видоспецифичной последовательности ДНК 16S с праймерами 27Fa-1492R. Выделение ДНК проводили с помощью набора ПРОБА-ГС компании Агродиагностика. Амплификацию ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей около 60 нг ДНК-мишени, 10 мкл дистиллированной воды, 10 мкл ПЦР-дилуэнта и 0,5 мкл растворов прямого и обратного праймеров на каждый из амплифицируемых образцов. Смесь разливали по 20 мкл в микропробирки из набора для проведения ПЦР GenPakPCRCore. ПЦР проводили в амплификаторе Biometra T1.

Антагонистические свойства бактерий оценивали методом попарного срачивания на среде картофельно-глюкозный агар (КГА) с чистыми культурами патогенов пасленовых культур, которые были получены из коллекций микроорганизмов кафедры микологии и альгологии МГУ и Аграрно-технологического института РУДН. Оценивали радиальный прирост колонии фитопатогена и зону ингибирования роста. Результаты оценивали через 10 и 20 суток роста в темноте при 24 °С.

## Результаты

Изучено взаимодействие 14 штаммов бактерий с патогенами пасленовых (табл 1.)

Таблица 1.

Результаты анализа антагонистической активности тестируемых бактерий

Штамм	Видовая принадлежность	Растение, из которого был выделен штамм	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Alternaria protenta</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Helminthosporium solani</i>
1АМО	<i>Alcaligenes spp</i>	Томат	+	+	+	-	++	++	++	+
2АМО	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Томат	+	+	+	-	++	+	++	-
3АОО	<i>Achromobacter spp</i>	Картофель	-	+	+	-	-	+	+	-
4РМО	<i>Pseudochrobactrum spp</i>	Перец	-	+	-	++	+	++	+	-
5АОО	<i>Alcaligenes spp</i>	Картофель	+	+	+	+	-	+	++	-
6РОО	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Картофель	++	++	++	++	++	++	++	++
7АМО	<i>Alcaligenes nematophilus</i>	Перец	-	+	+	-	-	+	+	-
8АРК	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Картофель	-	+	+	-	++	+	-	+
8/1АРК	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Картофель	-	-	+	++	-	-	+	++
9АРК	<i>Arthrobacter russicus</i>	Томат	-	+	-	-	-	+	-	-
10СМО	<i>Streptomyces polyasparticus</i>	Томат	-	+	-	+	+	++	+	+

Штамм	Видовая принадлежность	Растение, из которого был выделен штамм	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Alternaria protenta</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Helminthosporium solani</i>
11DMO	<i>Delftia spp</i>	Перец	+	+	-	+	-	-	+	+
12SMO	<i>Stenotrophomonas spp</i>	Перец	+	-	-	-	-	++	-	++
13AMO	<i>Alcaligenes spp</i>	Перец	+	++	-	-	++	++	+	+
14АОО	<i>Alcaligenes nematophilus</i>	Картофель	+	++	+	-	++	-	-	-

– колония бактерии не влияет на рост колонии гриба;

+ ограничивает рост колонии гриба, но при более длительном культивировании мицелий переходит через колонию бактерии;

++ останавливает рост колонии, есть четкая зона ингибирования роста гриба. При более длительном культивировании мицелий не переходит через колонию бактерии.

В результате исследований было показано, что все 14 изолятов останавливали рост фитопатогенов. Наибольшую антагонистическую активность проявил штамм 6РОО, который остановил рост всех исследуемых патогенов. Другие штаммы, такие как 1АМО, 2АМО, 4РМО, 8/1АРК, 12SMO, 13АМО и 14АОО проявили антагонистическую активность против нескольких патогенов. Штаммы 3АОО, 5АОО, 7АМО, 8АРК, 9АРК, 10SMO, 11DMO в некоторых случаях останавливали рост грибов, но чаще всего четкой зоны ингибирования роста не было.

### Заключение

Изучение взаимовлияние бактерий, выделенных из листьев пасленовых культур, и фитопатогенных грибов показало, что все исследованные бактерии в той или иной степени обладают антагонистическими свойствами. Были выявлены штаммы с высокими антагонистическими свойствами, перспективные для использования в качестве агентов биоконтроля. В целом, полученные данные свидетельствуют о возможности расширения спектра используемых в составе БСЗР микроорганизмов за счет выделенных из филопланы бактерий.

### Список литературы:

1. M. Hashemi, D. Tabet, M. Sandroni, C. Benavent-Celma, J. Seematti, C.B. Andersen, L.J. Grenville-Briggs The hunt for sustainable biocontrol of oomycete plant pathogens, a case study of *Phytophthora infestans* // Fungal Biology Reviews.– 2022. –V. 40. – P. 53-69. – Text : direct.
2. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. Пестициды. 2024 г.
3. Sachdev S, Singh RP. Isolation, characterisation, and screening of native microbial isolates for biocontrol of fungal pathogens of tomato. //Climate Change and Environmental Sustainability. – 2018. – V. 6. – P. 46-58.

4. Hu W. et al. Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum* //Phytopathology. – 2014. – Т. 104. – №. 12. – P. 1289-1297.
5. Card D, Walter M, Jaspers MV, Szejnberg A, Stewart A. Targeted selection of antagonistic micro-organisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. //Australasian Plant Pathology. – 2009. – 98. – P. 183-192.

# СТАБИЛИЗАЦИЯ БИОПРЕПАРАТОВ ВТОРИЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ БАКТЕРИЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА НАСЕКОМЫХ

А.С. Артемченко<sup>10, 11</sup>, Т.Н. Клементьева<sup>12</sup>, О.В. Поленогова<sup>13</sup>

Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) – наиболее известная основа большинства биопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей. *Bt* спороформирующие почвенные бактерии, распространенные повсеместно. *Bt* обладают высокой специфичностью для насекомых из различных отрядов благодаря наличию кристаллического эндотоксина (Сгу и/или Сут токсины). Активация Сгу-токсина происходит в щелочных условиях кишечника насекомых, что приводит к образованию пор, дальнейшему лизису клеток эпителиального слоя кишечника и септицемии. Септическое поражение происходит при вторжении бактерий микробиоты вместе с патогеном в гемоцель насекомых, что заканчивается гибелью хозяина. Проникновение патогена в кишечник насекомых сопровождается изменением структуры микробного сообщества, увеличением количества определенных групп симбиотических бактерий, продукты метаболизма которых могут приводить к изменению физико-химических условий в кишечнике хозяина, ускоряя развитие бактериоза.

В данной работе были изучены взаимоотношения между энтеробактериями (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter ludwigii*, *Serratia liquefaciens*) колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) и *Bt* subsp. *tenebrionis* (*morrisoni*). По результатам анализа взаимоотношений симбиотических и энтомопатогенных бактерий методом двойной культуры на плотных питательных средах были зарегистрированы зоны ингибирования роста *Bt* только при совместном культивировании *Bt* и *S. liquefaciens*. Совместное культивирование энтеробактерий и *Bt* в жидких питательных средах не выявило значительных изменений их роста, но приводило к защелачиванию рН среды на 0,15–0,33, по сравнению с одиночным культивированием этих бактерий. Совместное скормливание личинкам жуков как активных клеток *C. freundii*, *E. ludwigii*, *S. liquefaciens*, так и пептидных фракций их вторичных метаболитов и *Bt* привело к (× 1,3–6) увеличению гибели особей. Вполне возможно, что данное увеличение смертности личинок жуков было связано с защелачиванием

<sup>10</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>11</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>12</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>13</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

содержимого кишечника насекомых вследствие увеличения количества энтеробактерий или концентрации вторичных метаболитов микробиоты. Данное предположение могут косвенно подтверждать результаты анализа рН содержимого кишечника. Так, через 24 ч после скармливания как активных клеток *C. freundii*, *E. ludwigii*, *S. liquefaciens*, так и пептидных фракций их вторичных метаболитов и *Bt* было зарегистрировано увеличение значения рН в содержимом среднего отдела кишечника на 0,064–0,25 ( $p < 0,05$ , по сравнению со скармливанием только *Bt*).

По результатам проведенных исследований можно предположить, что кишечная микробиота посредством продукции вторичных метаболитов может вносить значительный вклад в регуляцию рН содержимого кишечника колорадского жука в первые часы развития бактериоза, что может обеспечивать необходимые физико-химические условия для активации Сгу-токсинов *Bt*. Однако, подтверждение нашей гипотезы требует дальнейших исследований.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке  
Российского научного фонда № 22–76–10051.*

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ НА БИОЧИПАХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОАРХИТЕКТониКИ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

А.Н. Асташонок<sup>14</sup>, Н.В. Яцкевич<sup>15</sup>, А.Л. Иванова<sup>16</sup>, Т.Ю. Степук<sup>17</sup>

Эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в мире и Республике Беларусь достаточно напряженная. Относительно высокая заболеваемость во многом обусловлены циркуляцией штаммов, обладающих гено- и фенотипической резистентностью к целому ряду современных противотуберкулезных препаратов. Фенотипическая устойчивость, т.е. морфологическая трансформация возбудителя часто возникает в процессе лечения. Это актуализирует разработку тактики и методов раннего выявления фенотипической лекарственной устойчивости для своевременной коррекции терапии. Актуальным является дифференцирование чувствительных и резистентных форм патогена. В этом плане метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) зарекомендовал себя одним из наиболее эффективных инструментов исследования структуры поверхности и свойств как индивидуальных белков, так и клеточных культур.

**Цель исследования:** получить модифицированные подложки на основе кремния для анализа архитектуры антибиотикорезистентных штаммов *M. tuberculosis*.

## Материалы и методы исследования.

**Возбудитель.** Проанализировано 100 культур *M. tuberculosis*, полученных от пациентов со следующими клиническими диагнозами по МКБ-10: фиброзно-кавернозный туберкулез легких, инфильтративный туберкулез легких, диссеминированный туберкулез легких, казеозная пневмония. Возраст пациентов – 34–68 лет. Чистую культуру микобактерий получали как на селективной жидкой, так и плотной питательных средах (среда Левенштейна-Йенсена), включая определение чувствительности

**Приготовление сенсорных покрытий (кремний).** Для очистки кремниевой поверхности пластины размером 100:100 мм помещали в концентрированный раствор  $H_2SO_4$  в течение 1 ч, или гидрофилизировали путем нагревания на водяной бане в смеси

<sup>14</sup> НИИ гигиены токсикологии эпидемиологии вирусологии и микробиологии, Минск, Беларусь

<sup>15</sup> ГУ РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь

<sup>16</sup> ГУ РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь

<sup>17</sup> НИИ гигиены токсикологии эпидемиологии вирусологии и микробиологии, Минск, Беларусь

$\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$  (соотношение компонентов 5:1:1) в течение 15 мин при температуре +72 °С. Далее тщательно отмывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре до использования.

Для визуализации микобактерий использовали нанотехнологический подход на основе метода микроконтактной печати, позволяющий проводить локальный перенос исследуемого вещества (молекулы) на сенсорную твердотельную поверхность. В качестве мастера (основы) использовали калибровочную решетку для атомно-силового микроскопа TGZ3 (высота «ступенек»  $540\pm 2$  нм, шаг 3 мкм, т.е. поверхность со строго заданными участками поверхности).

Следующим этапом служило формирование на поверхности подложек различных типов сенсорных покрытий (СП), которые были модифицированы пленкой катионного полиэтиленimina или анионного полистиролсульфонат-натриевой соли.

На подготовленные «биочипы» наносили по 100 мкл аликвот микобактерий, предварительно дезактивированных 2,5% глутаральдегидом. Исследование проводили на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Digital Instruments, Santa Barbara, США), оборудованном J-сканером. Использовали контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» (Veeco, США) из  $\text{Si}_3\text{N}_4$  с константами упругости 0,12 и 0,36 Н/м и тейпинговые зонды из кремния с резонансной частотой ~315 кГц.

**Результаты исследования и обсуждение.** При фиксации образцов культур микобактерий на специально приготовленных подложках были получены высококонтрастные изображения возбудителя. Как правило, внешняя оболочка *M. tuberculosis* несет отрицательный заряд благодаря наличию гликопротеинов, миколовых кислот, арабиногалактана на поверхности клеточной стенки. Следовательно, микобактерии могут быть фиксированы на поверхности электростатически. Нами было показано, что наилучший вариант фиксации микобактерий реализуется на положительно заряженном полиэлектролите – полиэтиленimine. При этом был использован контактный режим сканирования.

У микобактерий, выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, имеющих резистентность к одному или нескольким одновременно препаратам, наблюдалось изменение морфологии, формы и размера. Неодинаковый цвет различных участков бактерии на изображении трения свидетельствовал о различной «жесткости» отдельных конструкций возбудителя. На изображении трения вокруг бактерий визуализировались ореолы того же оттенка, что и на поверхности. По-видимому, в процессе высушивания такого образца имеет место выделение нуклеопротеидов и белковых молекул, которые, по всей видимости, имеют отрицательный заряд и фиксируются на положительно заряженной поверхности полиимина.

Показано также, что адгезия *M. tuberculosis* к поверхности положительно заряженной пленки полиэтиленimina различна для различных образцов. Наиболее прочно удерживается на поверхности культура немодифицированных бактерий. Сделан вывод, что заряд поверхности клеточной мембраны антибиотикорезистентных форм возбудителей туберкулеза отличается от культуры сравнения.

Благодаря фиксации клеток с окружающим клеточным материалом на положительно заряженной поверхности на изображении в режиме трения нам удалось зарегистрировать акты обмена микобактерий транзитными молекулами и продукцией фрагментов внеклеточного матрикса и капсулоподобного вещества.

*Адгезия M. tuberculosis на кремниевые подложки и анализ архитектоники возбудителя с использованием тейпингового режима АСМ.* Показано, что большинство из визуализированных бактериальных структур были представлены объектами палочковидной формы размером от 1,3 до 5–7 мкм и диаметром 0,3–0,6 мкм с хорошо выраженной капсулоподобной субстанцией в виде аморфной бахромчатой структуры. Средние значения размерных параметров возбудителя, составили  $3,53 \pm 0,31$  мкм в длину;  $0,43 \pm 0,16$  мкм в ширину и  $1,37 \pm 0,15$  мкм в высоту, толщина клеточной стенки –  $17,8 \pm 0,9$  нм. Поверхность клеточной стенки при более детальном анализе оказалась относительно гладкой с недостаточно развитым рельефом, среднеквадратичная шероховатость на пиках не превышала  $5,75 \pm 0,16$  нм.

### Заключение

С помощью атомно-силовой микроскопии изучены особенности морфологии морфоваров *M. tuberculosis*, осажденных на поверхность подслоя полиэтиленimina на кремнии. Разработанная методика позволила установить наличие в анализируемых образцах большого количества атипичных, плеоморфных бактерий. Перспективно использование разработанной платформы, активированной полиэтиленимином, для наноскопического анализа фенотипически измененных лекарственно-устойчивых микобактерий. Новые данные позволят констатировать развитие резистентности и скорректировать тактику антибактериальной терапии туберкулеза.

# МОЛЕКУЛЯРНО БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ОЛИГОТРОФИКАЦИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СПОСОБОВ УПРАВЛЕНИЯ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ИХ ТРОФИКОЙ

Д.И. Батуев<sup>18</sup>, М.В. Семенов<sup>19</sup>, А.М. Семенов<sup>20</sup>

Олиготрофикация – это процесс преобразования почвенных экосистем (ПЭ), включая агроэкосистемы в состояние, характеризующееся низкой концентрацией доступных легкоусвояемых биофильных элементов (как азот, фосфор, калий и даже углерод), но высоким общим содержанием этих и других элементов, а также высоким разнообразием и обилием сапротрофной микробиоты.[Semenov.1991] Процесс направлен на создание устойчивых и здоровых почвенных экосистем, которые более устойчивы к нарушающим воздействиям и более эффективно конкурентно подавляют фитопатогенные и другие паразитарные микроорганизмы благодаря доминированию сапротрофов. [Семенов и др., 2016]. Управление экосистемами, включая почвенные, условиями их трофики (олиготрофикации), представляет собой сложный и важный процесс, влияющий на биологическое разнообразие, т.е., «через» биоразнообразие и изменение устойчивости экосистем к природно-климатическим и антропогенным воздействиям [Семенов и др., 2011].

Настоящее исследование направлено на оценку влияния изменения трофики ПЭ путем различных органических и минеральных воздействий на микробные сообщества (МС) ПЭ, а, следовательно, и на некоторые микробиологические показатели активности МС. Анализ заключался в количественной оценке микробного разнообразия в ПЭ и оценке активности микробных сообществ в виде базальной и субстрат-индуцированной дыхательной активности почвы и численности мицелия и спор микромицетов.

<sup>18</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

<sup>19</sup> Федеральный исследовательский центр «Почвенный институт имени В.В. Докучаева», Москва, Россия.

<sup>20</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

Для проведения анализа были отобраны почвенные образцы из различных участков почвы, которые подвергаются олиготрофикации. Эти почвы экспериментально подвергались эвтрофикации с 2011 по 2019 год. С 2019 года, т.е., 5 лет назад, прекращено внесение органических веществ и минеральных элементов в эти ПЭ. Виды органических веществ и минеральных элементов, вносимых в почву и дозировки были, такими: без внесения органических веществ и минеральных элементов - (контроль); дозы внесения минеральных элементов: N1P1K1 (N90P75K100); N2P2K2 (N180P150K200); N3P3K3 (N270P225K300); N4P4K4 (N360P300K400); дозы внесения органических веществ: 25т/га; 50т/га; 75т/га; 100т/га. [Семенов и др., 2023]. Были проведены анализы МС.

Для определения субстрат-индуцированного дыхания (СИД), образцы почвы иницировались с глюкозой (10 мг/г почвы), затем интенсивность выделения CO<sub>2</sub>, анализировались на газовом хроматографе с последующим определением скорости СИД и расчетом углерода микробной биомассы. Для определения базального дыхания (БД), дыхание образцов почвы иницировали внесением воды, CO<sub>2</sub> определяли также на газовом хроматографе, определили скорость БД, и рассчитывали удельное дыхание микробной биомассы (qCO<sub>2</sub>). Люминесцентной микроскопией анализировали почвенные образцы на количество спор грибов и длины его мицелия. Для анализа qPCR из почвенных образцов была выделена ДНК, с которой провели секвенирование, чтобы получить количественную характеристику биомассы архей, бактерий, грибов.

Микробная активность, определяемая как СИД, на момент завершения времени проведения эвтрофикации (2019г.) в вариантах с внесением минеральных элементов демонстрировала снижение интенсивности СИД. Это снижение было пропорционально увеличению вносимых концентраций минеральных добавок (эвтрофикация). В этих почвах подвергавшихся пятилетней олиготрофикацией от избытка минеральных добавок наблюдалось восстановление СИД до исходного уровня, аналогичного контрольным показателям. В участках подвергавшихся эвтрофикации за счет внесения органических веществ, произошло, на момент завершения эвтрофикации, существенное повышение интенсивности СИД, но при проведении пятилетней олиготрофикации уровень СИД снизился, однако он остался выше контрольных значений, что можно объяснить накоплением органического вещества в этих участках и увеличением количества микроорганизмов.

Результаты БД демонстрируют, что длительная эвтрофикация почв минеральными добавками не привела к каким-то изменениям БД, но в результате олиготрофикации наблюдается какое-то увеличение БД в почвах подвергавшихся минеральной эвтрофикацией. Участки, подвергавшиеся эвтрофикации за счет органических веществ, показали колоссальный рост БД, коррелирующий с увеличением концентрации органических добавок, что и наблюдалось при определении СИД. Однако после пятилетней олиготрофикации, показатели БД снизилась до уровня контроля, что не наблюдалось при определении СИД.

Количественный анализ микробных популяций (архей, бактерий) полученный методом qPCR, на момент завершения эвтрофикации минеральными элементами выявил, что с увеличением концентрации минеральных элементов снизилась численность бактерий и архей. Однако, после пятилетней олиготрофикации этих же участков, численность архей значительно возрастает, превышая контрольные показатели, в то время как количество бактерий остается примерно на одном уровне. Определение численности архей и бактерий при эвтрофикации почв органическими веществами показала значительное увеличение численности архей, как и бактерий, с увеличением концентрации вносимой органики. После пятилетней олиготрофикации отмечается незначительно снижение количества архей, но значительно снижение количества бактерий. qPCR микромицетов показал аналогию в реакции на минеральную эвтрофикацию и олиготрофикацию с бактериями, также как и на органическую эвтрофикацию. Олиготрофикация почв независимо от способа их эвтрофикации, практически восстановила показатели численности микромицетов до уровня контроля.

Люминесцентной микроскопией показано, что олиготрофикация после эвтрофикации почв органическими веществами приводит к уменьшению длины, мицелия, хотя методом qPCR не выявляется сокращение численности микромицетов. [Nikitin et al., 2022]

Использованные методы выявления и определения результатов олиготрофикации в ПЭ позволяют выявлять протекаемые в почвенных экосистемах изменения. Метод управления микробными сообществами через их трофику – олиготрофикация ПЭ объективен и адекватен.

### Список литературы:

1. Семенов А.М., Семенов В.М., ван Бругген А.Х.К. Диагностика здоровья и качества почвы // *Агрохимия*. 2011. № 12. С. 4–20.
2. Семенов В.М., Лебедева Т.Н., Зинякова Н.Б., Соколов Д.А., Семенов М.В. Эвтрофикация пахотной почвы: сравнительное влияние минеральной и органической систем удобрения // *Почвоведение*. 2023. № 1. С. 58-73. DOI: 10.31857/S0032180X226006761.
3. Nikitin D.A., Semenov M.V., Chernov T.I., Ksenofontova N.A., Zhelezova A.D., Ivanova E.A., Khitrova N.B., Stepanov A.L. Microbiological Indicators of Soil Ecological Functions: A Review // *Eurasian Soil Science*. 2022. Т. 55. № 2. С. 221–234. DOI: 10.1134/S10642293220200902.
4. Semenov A.M. Physiological bases of oligotrophy of microorganisms and concept of microbial community // *Microbial Ecology*. 1991. Т. 22. С. 239–247. Springer Verlag, Germany.
5. Семенов А.М., Глинушкин А.П., Соколов М.С. Органическое земледелие и здоровье почвенной экосистемы // *Достижения науки и техники АПК*. 2016. Т. 30. № 8. С. 5–8.

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ИКОНЫ «ДЕИСУСНЫЙ ЧИН НА ОДНОЙ ДОСКЕ (13 ФИГУР)» ИЗ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕИ И ПОДБОР АНТИСЕПТИКОВ ДЛЯ ЕЕ ЗАЩИТЫ

К.Я. Башкирова<sup>21, 22, 23</sup>, А.А. Ермолюк<sup>24</sup>, О.Б. Воробьева<sup>25</sup>,  
М.В. Шитов<sup>26</sup>, Л.А. Александрова<sup>27</sup>, А.Р. Хомутов<sup>28</sup>,  
В.А. Макаров<sup>29</sup>, А.А. Жгун<sup>30</sup>, Д.А. Авданина<sup>31</sup>

Объекты культурного наследия, в том числе произведения живописи, состоят из материалов, многие из которых могут подвергаться биодеструкции [1]. При эффективном разрушении произведений живописи во многих случаях обнаруживают консорциумы микроорганизмов-деструкторов, включающие плесневые грибы и бактерии, причем грибы часто играют решающую роль в биопоражении [2,3]. В нашей работе определили состав микроорганизмов, нанесших биопоражение иконе с частичной утратой красочного слоя Новгородской школы конца 16-го века «Деисус из 13 фигур», находящейся фонде хранения Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский переулок 10, Москва). Доминантным микроорганизмом оказался плесневый гриб *Iodophanus* sp. STG-150. Этого представителя семейства *Pezizaceae* впервые изолировали с иконы, однако описанные ранее штаммы *Iodophanus* sp. колонизируют целлюлозные субстраты, которые также входят в композитный материал икон. Для таргетированного воздействия при будущей обработке иконы «Деисус из 13 фигур» изучили чувствительность *Iodophanus* sp. STG-150 к панели антисептиков, среди которых были

<sup>21</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>22</sup> Московский Политехнический Университет, Москва, Россия

<sup>23</sup> E-mail: baschckirowa.kristina@yandex.ru

<sup>24</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>25</sup> Государственная Третьяковская галерея, Москва, Россия

<sup>26</sup> Государственная Третьяковская галерея, Москва, Россия

<sup>27</sup> ИМБ РАН, Москва, Россия

<sup>28</sup> ИМБ РАН, Москва, Россия

<sup>29</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>30</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>31</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

как соединения, используемые для защиты живописных материалов, так и разрабатываемые препараты. Наиболее эффективными оказались новые соединения, такие как фосфорозамещенный аналог аспарагиновой кислоты и группа гетероциклических серосодержащих соединений. Полученные в нашей работе данные позволяют перейти к реставрационному этапу.

Икона «Деисусный чин на одной доске (13 фигур)» из коллекции А.И. Анисимова, историка и реставратора древнерусской живописи, поступила в Государственную Третьяковскую галерею (ГТГ) в 30-х гг. прошлого столетия. Щит иконы, шириной с иконостас, состоит из двух липовых досок, скреплённых с оборота тремя врезными шпонками. Иконографическая схема икон относится к новгородской традиции (Рис. 1А). В Третьяковскую галерею памятник поступил сильно загрязнённым, со следами копоти и восковых подтёков, наблюдались крупные утраты грунта, шелушение и вздутия красочного слоя, отставания левкаса, паволоки, в том числе и аварийные (Рис. 1В).

С темперной поверхности иконы в местах предполагаемого микробиологического поражения и в контрольных зонах отобрали 15 микробиологических проб (Рис. 1А). Аликвоты отобранных проб инокулировали на 6 агаризованных питательных сред. Для проб 5, 7, 11, 14 получили бактериальные изоляты; для проб 4, 8, 9, 12 получили изоляты смешанного типа (грибы и бактерии); после инокуляции аликвот проб 1, 2, 3, 6, 10, 13, 15 не наблюдали роста микроорганизмов. Для полученных культур провели макро-, микроморфологический анализы и генотипирование.

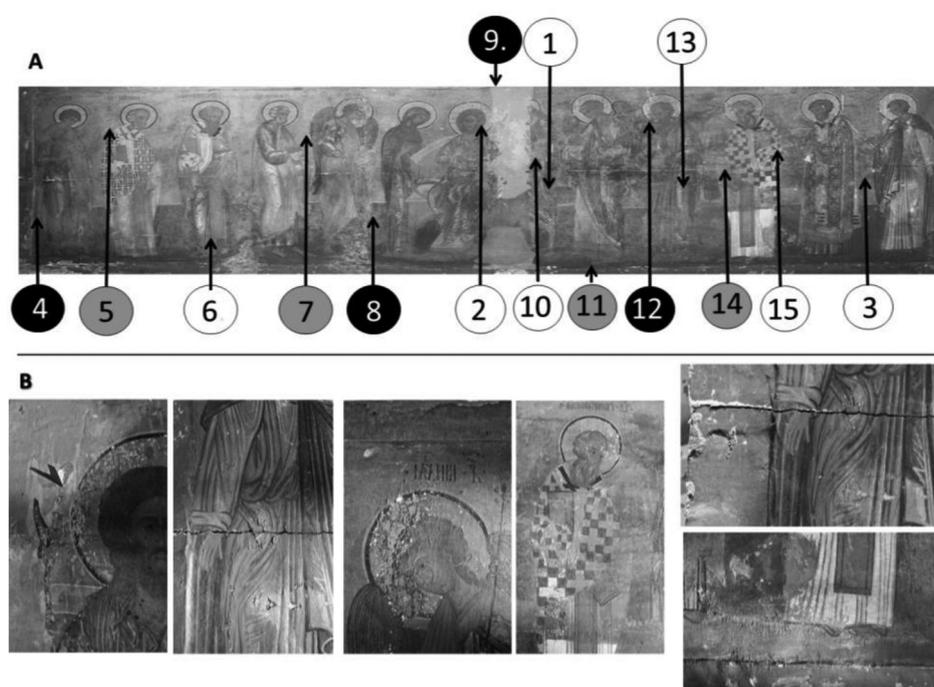


Рис. 1. Икона «Деисус из 13 фигур», конец 16 в. Яичная темпера, 215x59,5x4 см.  
 А – Карта отбора проб: в чёрных кружках – совместный рост гриба и бактерий;  
 в серых кружках – рост бактерий; в белых кружках рост не отмечен.  
 В – Фрагменты иконы с местами повреждений

Генотипирование провели после амплификации гипервариабельных районов рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS1 и ITS2). Обнаруженные бактерии относились к классам *Gamma*proteobacteria (*Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp.) и *Bacilli* (*Bacillus* sp.). Все грибные изоляты относились к *Iodophanus* sp. и имели характерную для этого вида морфологию (Рис. 2). Поскольку пробы с *Iodophanus* sp. отобрали из проблемных зон, можно было предположить, что этот микроорганизм участвует в биопоражении. С *Iodophanus* sp. продолжили работу, в качестве тест культуры использовали изолят STG-150. В реставрационной мастерской ГТГ изготовили серию из 18-ти макетов с выкрасками отдельных материалов темперной живописи, использованных при изготовлении «Деисус из 13 фигур». Затем провели инокуляцию тест культуры STG-150 на макеты, показали способность этого гриба к биодеструкции изученных материалов.

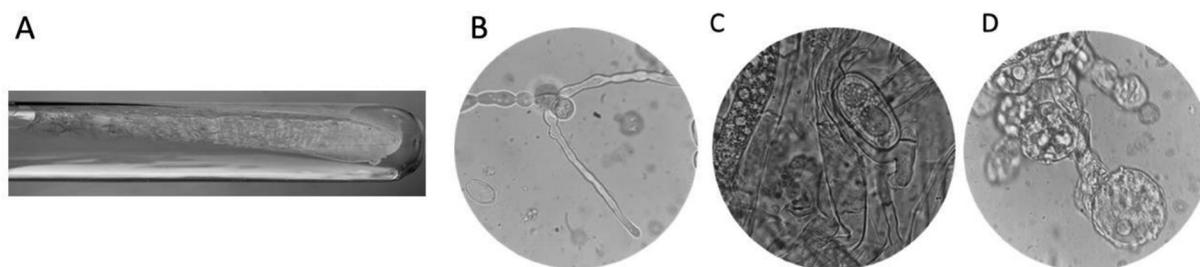


Рис. 2. Характерный фенотип *Iodophanus* sp. STG-150 при культивировании на агаризованной среде Чапека-Докса. А – апотеции на скошенном агаре (плодовые тела); В – растущая парафиза; С – эллиптическая аскоспора; D – склероции (эксципулум)

Для проведения последующих реставрационных работ по устранению гриба-деструктора *Iodophanus* sp. с «Деисус из 13 фигур» провели таргетированный подбор биоцидов. Изучили чувствительность штамма STG-150 против панели антисептиков, включающий применяемые в реставрации Катамин АБ и пентохлорфенолят натрия, а также разрабатываемые нами новые перспективные биоциды, относящиеся к классам алкилнуклеозидов, фосфозамещенных аналогов аминокислот и аналогов гидроксамовых кислот. Наиболее активными оказались фосфорозамещенный аналог аспарагиновой кислоты и аналоги гидроксамовых кислот. Эти соединения потенциально могут быть использованы при реставрации иконы «Деисус из 13 фигур».

### Список литературы:

1. Avdanina, D., Zghun, A. Rainbow code of biodeterioration to cultural heritage objects. *Herit. Sci.* 2024, 12, doi:10.1186/s40494-024-01298-y.
2. López-Miras, M. del M.; Martín-Sánchez, I.; Yebra-Rodríguez, Á.; Romero-Noguera, J.; Bolívar-Galiano, F.; Etnenauer, J.; Sterflinger, K.; Piñar, G. Contribution of the Microbial Communities Detected on an Oil Painting on Canvas to Its Biodeterioration. *PLoS One* 2013, 8, e80198, doi:10.1371/journal.pone.0080198.
3. Zhgun, A.; Avdanina, D.; Shumikhin, K.; Simonenko, N.; Lyubavskaya, E.; Volkov, I.; Ivanov, V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLoS One* 2020, 15, e0230591, doi:10.1371/journal.pone.0230591.

# ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ШТАММА *L. PLANTARUM* 8РА-3 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ *S. AUREUS*

Ю.С. Беляева<sup>32</sup>, Е.А. Воробьева<sup>33</sup>, О.Г. Орлова<sup>34</sup>

## Введение

Условно-патогенные бактерии *S. aureus* являются представителями нормальной микрофлоры человека, однако у лиц с ослабленным иммунным статусом они способны вызвать гнойно-воспалительные заболевания. Излюбленными местами колонизации стафилококков являются кожа и слизистые оболочки, при этом наиболее часто данные бактерии обнаруживаются в носоглотке (20–40%). Носительство *S. aureus* среди медицинского персонала стало проблемой общественного здравоохранения, поскольку стафилококки являются распространенной причиной послеоперационных инфекционных осложнений.

**Целью** данного исследования было оценить эффективность использования штамма *L. plantarum* 8РА-3 для лечения и профилактики заболеваний, вызванных *S. aureus*.

**Материалы и методы.** В исследовании участвовали 99 студентов 2 курса медицинского института СПбГУ в возрасте от 18 до 21 года, из которых 30 лиц мужского и 69 лиц женского пола. Материал отбирали при помощи стерильного тампона. Посев проводили в чашках Петри на плотную питательную среду элективный солевой агар (7,5% NaCl) (НИЦФ, Россия). Затем посеvy культивировали в термостате при 37 °С, в течение 24 часов. Идентификацию *S. aureus* проводили с помощью теста латекс-агглютинации Staph-plus, (Bio-Rad Laboratories, США). Чувствительность культур стафилококков к метаболитам лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 (Флорин-форте, ПроБиоФарм, Россия) определяли методом штрихов.

**Результаты и обсуждение.** Культуры *S. aureus* выделены из носоглотки у 62% студентов, (26,2% ♂, 73,8% ♀). Метаболиты *L. plantarum* 8РА-3 продемонстрировали широкий спектр антимикробной активности в отношении культур *S. aureus*. Клетки всех выделенных штаммов стафилококков оказались чувствительны к их действию. Степень по-

<sup>32</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>33</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>34</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

давления составляла от 10 до 100%. Результаты проведенных исследований показали, что применение препаратов на основе пробиотических *L. plantarum* 8РА-3 будет эффективно для лечения и профилактики стафилококковых инфекций.

### **Выводы**

Процент выявления *S. aureus* среди студентов медицинского института СПбГУ оказался достаточно высок, чтобы обратить внимание на риск возникновения осложнений в клинической практике. Антагонистическое действие, оказанное метаболитами *L. plantarum* 8РА-3 свидетельствует о том, что лактобактерии могут быть потенциально использованы для лечения и профилактики инфекций, вызванных *S. aureus*.

# ВЫБОР ТЕСТ-КУЛЬТУР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АЛКИЛНУКЛЕОЗИДОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИСЕПТИКОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПРОИЗВЕДЕНИЙ ЖИВОПИСИ

Е.Е. Бенько<sup>35, 36, 37</sup>, А.А. Ермолюк<sup>38</sup>, Л.А. Александрова<sup>39</sup>,  
Д.А. Макаров<sup>40</sup>, М.В. Ясько<sup>41</sup>, Д.А. Авданина<sup>42</sup>, А.А. Жгун<sup>43</sup>

Микроорганизмы представляют собой важнейшую причину разрушения объектов культурного наследия, включая произведения живописи. Одним из наиболее эффективных методов защиты, направленных на борьбу с биопоражением, является использование антисептиков. Существует множество соединений различных классов, применяемых для охраны объектов культурного наследия, однако количество антисептиков, используемых в живописи, крайне ограничено и значительно сократилось в последние годы. Многие антисептики были исключены из рекомендованных из-за их взаимодействия с живописными материалами или токсичности для реставраторов и посетителей музеев. Ужесточенные требования к антисептикам для живописи привели к тому, что в последние годы на рынок не поступили новые препараты. В результате в настоящее время существует необходимость в разработке антисептиков нового поколения. Актуальной задачей является создание соединений широкого спектра действия, которые смогут эффективно защищать произведения искусства от микробиологического поражения, не влияя на физико-химические свойства материалов и оставаясь нетоксичными для людей.

Ранее охарактеризовали микробиологическое сообщество в залах древнерусской живописи основного исторического здания Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский переулок, 10, Москва) [1]. После изучения энзиматической активности

<sup>35</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, г. Москва, Россия

<sup>36</sup> Московский Политехнический Университет, г. Москва, Россия

<sup>37</sup> E-mail: elizavetabenko8@gmail.com

<sup>38</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, г. Москва, Россия

<sup>39</sup> ИМБ РАН, г. Москва, Россия

<sup>40</sup> ИМБ РАН, г. Москва, Россия

<sup>41</sup> ИМБ РАН, г. Москва, Россия

<sup>42</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, г. Москва, Россия

<sup>43</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, г. Москва, Россия

микроорганизмов на макетах с отдельными лакокрасочными материалами определили доминантные микроорганизмы-деструкторы, потенциально опасные для хранящихся произведений. Ими оказались плесневые грибы, в том числе, ксерофилы. Одними из исследуемых соединений стали представители нового класса антибиотиков – алкилнуклеозиды, для которых в настоящее время не установлен механизм действия [2]. Предварительные результаты показывают, что эти соединения являются многообещающими антисептиками, так как не влияют на спектральные и поверхностные свойства материалов и работают более эффективно в составе живописных материалов по сравнению с традиционными антисептиками.

Несмотря на множество экспериментов на бактериях, грибах и клеточных культурах млекопитающих, которые демонстрируют высокую эффективность изучаемых алкилнуклеозидов, их механизм действия по-прежнему остается неизвестным. Один из подходов к поиску мишени связан с определением клеточного компартмента, где происходит взаимодействие соединения. Для этой цели было решено использовать клик-химическую реакцию между соединениями, содержащими азидную и алкильную группы. Одна из этих групп должна быть в составе алкилнуклеозида, а другая находиться в составе коммерческого флуоресцентного красителя. Поэтому после протекания клик-химической реакции можно визуализировать локализацию алкилнуклеозида по флуоресценции связавшейся с ним молекулы флуоресцентного красителя. Поскольку у изученных ранее алкилнуклеозидов отсутствовали нужные группы, для эксперимента синтезировали модифицированные соединения ALA-108 и MV-2 (с введенной азидной группой), а также ALA-122 и DM-22 (с введенной этиновой группой), формулы которых представлены на Рис. 1:

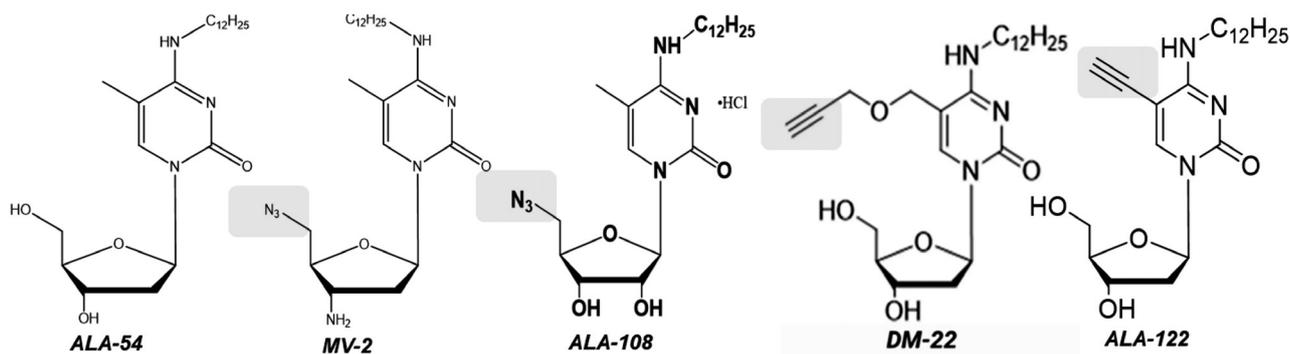


Рис. 1. Формулы применяемых в работе антисептиков (ALA-54 – контрольное соединение, MV-2, ALA-108, DM-22 и ALA-122 – модифицированные алкилнуклеозиды)

Поскольку любые модификации могут значительно воздействовать на активность алкилнуклеозидов, целью нашей работы было характеристика антимикозных свойств новых соединений MV-2, DM-22, ALA-108, ALA-122 и выбор тест-культур для визуализации воздействия в грибной клетке методом клик-химии. Для этого изучили работу соединений против 7-ми штаммов грибов-деструкторов temperных материалов: *Aspergillus*

*versicolor* STG-25G (МК260015.1), *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36 (MW590700.1), *Cladosporium halotolerans* STG-52B (МК258720.1), *Simplicillium lamellicola* STG-96 (МК262921.1), *Aspergillus protuberus* STG-106 (МК268342.2) и *Penicillium chrysogenum* STG-117 (MW556011.1), *Aspergillus niger* STG-143B (МК271273.1).

В качестве внутреннего контроля использовали ранее охарактеризованный алкилнуклеозид с высокой антимикозной активностью ALA-54 [2,3]. Уровень ингибирования изучали по отношению радиального роста грибного мицелия на агаризованной среде Чапека-Докса с добавлением 0.2 мМ соединений (алкилнуклеозидов или стандартных антисептиков) к росту на контрольной среде (без добавок). Исследование проводили при 26 °С в течение 35 сут после инокуляции тест-культур на опытные и контрольные агаризованные среды, измерения проводили каждые 3 дня. Оказалось, все изученные модификации ALA-54 приводят к частичной потере активности. Так к концу культивирования воздействие от MV-2 снизилась на 59%, ALA-108 – на 50%, DM-22 – на 45,4%, а ALA-122 – на 44,5% по отношению к контрольному соединению.

Наиболее подходящими для экспериментов с ALA-108 оказались культуры *Ulocladium* sp. AAZ-2020a, STG-36, *C. halotolerans* STG-52B, *A. protuberus* STG-106 и *P. chrysogenum* STG-117, поскольку чувствительность этих штаммов против ALA-108 была близка к контрольному немодифицированному ALA-54. Соединение ALA-122 проявило наибольшую активность в отношении *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36, *C. halotolerans* STG-52B, *P. chrysogenum* STG-117 и *A. niger* STG-143B. К соединению MV-2 повышенную чувствительность проявили *A. versicolor* STG-25G, *Ulocladium* sp. AAZ-2020a, STG-36, *C. halotolerans* STG-52B, *S. lamellicola* STG-96, *A. protuberus* STG-106 и *P. chrysogenum* STG-117. К соединению DM-22 были чувствительны штаммы *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36, *C. halotolerans* STG-52B, *P. chrysogenum* STG-117 и *A. niger* STG-143B. Все изученные соединения проявляли лучшая активность в отношении *P. chrysogenum* STG-117.

Таким образом, в нашей работе показано, что принципиально возможно получать активные в отношении плесневых грибов производные алкилнуклеозидов с модификациями для использования в клик-химических реакциях.

### Список литературы:

1. Zhgun A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. 2020. Vol. 15, № 4. P. e0230591.
2. Alexandrova L.A. et al. Discovery of novel N4-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // Eur. J. Med. Chem. 2021. Vol. 215.
3. Alexandrova L.A. et al. 3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides // New J. Chem. The Royal Society of Chemistry, 2022. Vol. 46, № 12. P. 5614–5626.

# ВЛИЯНИЕ МЕЗОЭКОСИСТЕМ НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОБИОТЫ ЭПИЛИТНОГО ЛИШАЙНИКА PARMELIA SAXATILIS (L.) ACH.

А.С. Бобко<sup>44</sup>, А.В. Локтева<sup>45</sup>

Лишайники являются самоподдерживающейся системой, состоящей из гетеротрофного и фотоавтотрофного компонентов. Их совместное существование обеспечивает поддержание всего симбиотического организма. Лишайники входят в состав растительных сообществ как пионерные организмы при освоении безжизненных пространств, принимают участие на начальных этапах почвообразования. Благодаря видовому разнообразию и широкому распространению в различных экотопах, лишайники вызывают интерес к их экосистемной роли. Как пойкилогидрические организмы, они обладают антиоксидантными и фотозащитными механизмами, что позволяет им выживать в экстремальных условиях.

Несмотря на достаточную изученность микобионта и фотобионта лишайников, микробный компонент и его взаимодействие с лишайником и окружающей средой остаются малоизученными. В последние годы микробиота, ассоциированная с талломом, привлекает всё больше внимания. Установлено, что лишайниковый микробиом является важным и структурно интегрированным элементом симбиоза. Микроорганизмы распределяются по таллому неравномерно: наиболее стабильный микробиом в центре, а на краях он более вариабелен. Функциональная роль микробиоты заключается в поддержании всей симбиотической системы через снабжение питательными веществами, выработку гормонов роста, утилизацию старых частей таллома и защиту от патогенов.

Лишайники способны произрастать в различных мезоэкосистемах таких как скалы, засушливые районы, тундра, поэтому микробиота ассоциированная с талломом подвергается множеству стрессовых факторов: чрезмерная инсоляция, резкие колебания влажности, изменения осмотического потенциала, механические воздействия и влияние метаболитов микобионта и фотобионта. Эти условия могут стимулировать синтез различных вторичных метаболитов, включая антимикробные соединения, что особенно актуально в контексте угрозы лекарственной устойчивости бактерий. Однако влия-

<sup>44</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>45</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия.

ние мезоэкосистем на антимикробные свойства остаётся малоизученным. Цель исследования заключалась в оценке влияния мезоэкосистем на антимикробную активность микробиоты эпилитного лишайника *Parmelia saxatilis* (L.) Ach.

Для эксперимента было отобрано 24 поликультуры ассоциативной микробиоты эпилитного лишайника *P. saxatilis* – типичного вида скальных местообитаний и одного из самых распространённых лишайников Голарктики. Он имеет широкий ареал, охватывающий оба полушария и все климатические зоны, кроме экваториальной. Образцы поликультур собирали в трех разных биотопа – 9 образцов с лесного, 6 образцов с рудерального и 9 образцов с супралиторальной зоны Белого моря. Для отбора поликультур использовали только здоровые и молодые талломы лишайников без видимых повреждений. Для каждого таллома лишайника извлекали три образца поликультуры – один с центра таллома и два с края таллома.

Для лесного биотопа тип сообщества представлял сосняк чернично-разнотравный, с сильной затенённостью и отсутствием антропогенного воздействия. Все лишайники произрастали на базальте, самой распространённой эффузивной породе с плотной тонкозернистой структурой. Для рудерального биотопа характерно открытое местообитание и влияние машин, лишайники росли на кислой шунгитсодержащей породе (С > 45%). Для супралиторальной зоны характерно разная степень освещённости и антропогенного воздействия. На лишайники также влияли солёные брызги, наледи и холодные ветра. Все образцы росли на гнейсовой породе на краю сосняка.

Антимикробную активность оценивали кросс-стрик методом в трёх биологических и трёх технических повторях. Тестировались поликультуры и монокультуры, выделенные из поликультур с антимикробной активностью. В качестве тест-культур использовали *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Candida albicans*. Антимикробная активность против *S. aureus* ATCC 29213 была обнаружена у 8 поликультур, из которых 5 также проявили активность против *C. albicans*.

Для образцов 1, 2 и 3, собранных с края таллома в лесном биотопе, зоны ингибирования против *S. aureus* ATCC 29213 варьировали от 3,5 до 6,3 мм, с максимальным значением у образца 2. Зоны ингибирования против *C. albicans* у образцов 1 и 2 составляли от 2,3 до 6,0 мм, при этом наибольшее значение также наблюдалось у образца 2.

Для образца 4, собранного с центра таллома, и образцов 5, 6 и 7, взятых с края таллома в рудеральном биотопе, зоны ингибирования против *S. aureus* ATCC 29213 находились в пределах от 1,7 до 5,3 мм, с наибольшим значением у образца 5. Зоны ингибирования против *C. albicans* у образцов 4 и 5 составляли от 4,5 до 5,3 мм, максимальное значение наблюдалось у образца 4.

У образца 8, собранного с края таллома из супралиторальной зоны, зоны ингибирования против *S. aureus* ATCC 29213 и *C. albicans* составили  $3,7 \pm 0,5$  мм.

Следующим этапом было выделение монокультур с антимикробной активностью из поликультур, уже продемонстрировавших антимикробную активность. В результа-

те из 8 поликультур выделено 11 монокультур, активных против *S. aureus* ATCC 29213, из которых 6 также проявили активность против *C. albicans*.

Размеры зон ингибирования у четырех монокультур (1.1, 2.1, 3.1 и 3.2), полученных с лесного биотопа, против *S. aureus* ATCC 29213 варьировали от 7,0 до 11,5 мм. Наибольшие значения характерны для монокультуры 3.1. Кроме того монокультуры 1.1 и 2.1 проявили антимикробную активность против *C. albicans*, с зонами ингибирования  $3,0 \pm 0,5$  мм и  $11,3 \pm 1,5$  мм, где наибольшая зона наблюдалась у монокультуры 2.1.

У пяти монокультур (4.1, 5.1, 5.2, 6.1 и 7.1), полученных из рудерального биотопа, зоны ингибирования против *S. Aureus* ATCC 29213 варьировали от 5,0 до 14,3 мм. Наибольшая зона ингибирования была характерна для монокультуры 6.1. Также монокультуры 4.1 и 5.1 проявили активность против *C. albicans*, с зонами  $10,0 \pm 1,5$  мм и  $8,5 \pm 0,7$  мм, где наибольшая зона наблюдалась у монокультуры 4.1.

У двух монокультур (8.1 и 8.2), полученных из супралиторальной зоны, зоны ингибирования против *S. aureus* ATCC 29213 составили  $11,5 \pm 0,7$  мм и  $10,5 \pm 0,7$  мм соответственно. Наибольшая зона ингибирования была характерна для монокультуры 8.1. Обе монокультуры проявили активность против *C. albicans*, с зонами  $10,3 \pm 0,7$  мм и  $11,5 \pm 0,7$  мм, где наибольшая зона была также у монокультуры 8.1.

Анализируя культуральные, тинкториальные, морфологические и генетические признаки одиннадцати монокультур обнаружены четыре монокультуры, обладающие явными различиями, что позволяет классифицировать их как разные виды. Первая группа включает монокультуры 1.1, 4.1, 5.2, 8.1 и 8.2; вторая – 2.1 и 3.1; третья – 3.1, 5.1, 6.1 и 7.1. При этом для групп монокультур, встречающихся во всех трёх биотопах, наибольшие зоны ингибирования отмечены в биотопах с более суровыми факторами внешней среды.

Полученные результаты показывают, что микробиота, ассоциированная с *Parmelia saxatilis*, обладает способностью синтезировать антимикробные соединения. Антимикробная активность преимущественно наблюдалась у образцов, собранных с края таллома, за исключением 4-го образца. Отмечается, что поликультуры проявляют меньшую антимикробную активность по сравнению с выделенными из них монокультурами. Наибольшая активность была зафиксирована у монокультур из рудерального биотопа и супралиторальной зоны, где микробиота подвергается воздействию более суровых факторов окружающей среды. Также полученные результаты указывают на потенциал лишайниковой микробиоты как источника новых антимикробных соединений, что особенно актуально в условиях растущей лекарственной устойчивости патогенов.

# СКРЫТОЕ РАЗНООБРАЗИЕ. ОБЗОР СИМБИОТИЧЕСКИХ АССОЦИАЦИЙ ПРОКАРИОТ С МШАНКАМИ (BRYOZOA)

Е.А. Богданов<sup>46</sup>, М.А. Демидова<sup>47</sup>, А.Э. Вишняков<sup>48</sup>,  
О.Н. Котенко<sup>49</sup>, А.Н. Островский<sup>50</sup>

Симбиотические ассоциации широко распространены в различных экосистемах и являются их неотъемлемой частью. Среди морских обитателей встречается множество примеров симбиотических взаимодействий между разнообразными протистами, многоклеточными и прокариотами в самых разных вариациях. В то время как некоторые ассоциации (например кораллы и зооксантеллы, или губки и разнообразные населяющие их прокариоты) уже стали модельными объектами, многие другие симбиотические системы еще хранят в себе множество тайн. Наша работа посвящена изучению симбиотических взаимодействий симбиотических бактерий с широко распространенной в водных биотопах группой беспозвоночных-колониальных фильтраторов – типом мшанок (Bryozoa).

Первые упоминания симбиотических бактерий в мшанках датируются 60-тыми годами прошлого века, когда французская исследовательница Люто открыла несколько типов симбионт-содержащих органов в разных видах мшанок. Первый из описанных типов таких органов – вестибулярные железы, содержащие бактерий, до сих пор остается слабо изученным, однако другой тип – фуникулярные тела, получил значительно больше внимания. Модельным объектом для изучения симбиоза прокариот и мшанок стал вид *Bugula neritina* (отряд Cheilostomata). В результате серии работ были идентифицированы ее симбиотические гамма-протеобактерии “*Candidatus Endobugula sertula*”. Было установлено, что кроме тканей колоний, симбиотические прокариоты также локализируются в паллиальном синусе личинок, которые используют вторичные метаболиты, выделяемые бактериями для защиты от хищников. Кроме того, показана и метаболическая и генетическая коинтеграция симбионта и его хозяина. Схожие данные были получены и для другой симбиотической ассоциации между мшанками рода *Watersipora* и альфа-протеобактериями “*Candidatus Endowatersipora sp.*”.

<sup>46</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных

<sup>47</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных

<sup>48</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных

<sup>49</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных

<sup>50</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных

Наша научная группа уделяет много внимания изучению микроанатомии и ультраструктуры симбионт-содержащих органов, в первую очередь, у беломорских мшанок. В результате исследований вида *Aquiloniella scabra* были получены первые ультраструктурные данные о строении фуникулярных тел: состоящие из двух и более слоев клеток, окружающих изолированное пространство, в котором содержатся симбионты. При этом, в полость с бактериями вдаются многочисленные отростки клеток внутреннего слоя. Учитывая наличие в клетках стенки фуникулярного тела сложного синтетического аппарата, а также наличие признаков транспорта веществ, можно предположить, что эти органы являются «инкубаторами для выращивания» бактериальных клеток.

Впоследствии фуникулярные тела были описаны нами у вида *Dendrobeatia fruticosa*. Более того, поставленные на этом виде сезонные исследования выявили наличие процессов редукции тел и лизиса клеток бактерий ближе к осени. Примечательно, что лизис бактерий сопровождается формированием уникальных структур, предполагающих наличие бактериофагов в данной симбиотической ассоциации.

В процессе проведения работ по изучению других беломорских видов мшанок, структуры, подходящие по описанию фуникулярным телам, также были обнаружены в колониях *Bugulopsis peachii*, *Caberea* sp., а так же *Eucratea loricata*. Примечательно, что до сих пор фуникулярные тела обнаруживались исключительно в группе Buguloidea, однако обнаружение аналогичной структуры в *E. loricata*, относящейся к группе Scruparioidea, подразумевает независимое приобретение симбионтов в разных линиях мшанок.

Наконец, отличные от фуникулярных тел структуры, названные нами бактериальными телами, были обнаружены в колониях *Stomacrustula cruenta*. Отличающиеся резко электронно-плотным матриксом, клетки прокариот здесь располагаются между крупными, наполненными множеством гранул клетками хозяина. Между ними обнаружены признаки интенсивного обмена веществами. Наличие у симбиоза *S. cruenta* уникальных параметров и ультраструктурных признаков, нехарактерных для других мшанок, может являться признаком уникального метаболического взаимодействия в данной симбиотической ассоциации.

Следует отметить, что в настоящее время мы начали работы по молекулярной идентификации симбионтов мшанок. Одной из значимых находок стало обнаружение бактерий из группы Rhodobacteriacea в колониях и личинках *Patinella verrucaria* (отряд Cyclostomata). Симбиоты обнаружены в этой группе мшанок впервые, что свидетельствует о потенциальном наличии симбиотических ассоциаций у весьма широкого круга представителей типа Bryozoa.

*Исследование/проект выполнен при поддержке гранта РНФ No 23-14-00351.*

# СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ

Д.В. Бубнова<sup>51</sup>, С.В. Калёнов<sup>52</sup>

Галофильные микроорганизмы – это организмы, способные расти и развиваться в среде с высоким содержанием NaCl. Метаболизм галофильных организмов разнообразен и определяется состоянием среды обитания, в частности содержанием солей [1]. Гиперсоленые среды обычно характеризуются меньшим разнообразием, но при этом более высокой плотностью сообществ [2].

Производство биологически активных веществ с помощью галофилов имеет ряд преимуществ. Эти микроорганизмы перспективны для производства различных биологически активных веществ, в том числе для получения пептидов, аминокислот, необходимых в медицине, экзополисахаридов, липидов и других соединений. Галофильные бактерии и археи являются продуцентами каротиноидов, бактериородопсина, сенсорных белков, совместимых растворённых веществ, выступающих в роли осмопротекторов, различных ферментов, а также востребованы из-за синтезируемых ими веществ, которые стабильны при высоких температурах, различных концентрациях соли и значениях pH [3].

Экстремально галофильные микроорганизмы растут в среде с высокой концентрацией соли, что уменьшает, как считается, риск заражения посторонней микрофлорой во время культивирования, т. к. немногие микроорганизмы способны расти в данных условиях [4]. Их природная среда обитания позволяет, согласно публикациям, проводить культивирование в нестерильных условиях. Однако в данной среде могут расти и другие виды экстремально галофильных или высокогалотолерантных микроорганизмов. Важно исследовать взаимодействие между подобными микроорганизмами, чтобы исключить риск вытеснения исходной культуры, являющейся важным продуцентом, выяснить возможность их совместного культивирования.

Объектами исследования в данной работе являлись высокогалотолерантные бактерии *Halomonas utahensis*, экстремально галофильные археи *Halobacterium salinarum*, а также бактерии *Thalassobacillus devorans* и *Bacillus licheniformis*.

Целью работы являлось изучение динамики роста и развития галофильных микроорганизмов, стратегий их адаптации при изменении параметров среды, а также сравне-

<sup>51</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева

<sup>52</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева

ние выживаемости культур галофильных микроорганизмов при их совместном культивировании.

В исследовательской работе изучалось взаимодействие микроорганизмов: *Thalassobacillus devorans*, выделенных из проб засоленной почвы, которые были отобраны у побережья Черного моря в Пицунде из прикорневой зоны пицундской сосны; *Bacillus licheniformis*, выделенных из образцов придонного слоя из соленого озера Масазыр; *Halobacterium salinarum* из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов; и *Halomonas utahensis* из соленого озера Эльтон, – при их совместном культивировании. На первом этапе исследований были получены монокультуры галофильных микроорганизмов. На следующем этапе было проведено совместное периодическое культивирование галофильных архей и бактерий в колбах. В опытах использовали по две культуры микроорганизмов: *Thalassobacillus devorans* и *Halomonas utahensis*, *Thalassobacillus devorans* и *Halobacterium salinarum*, *Bacillus licheniformis* и *Halomonas utahensis*, *Bacillus licheniformis* и *Halobacterium salinarum*.

Количественный учет микроорганизмов после периодического культивирования производили с использованием микрометода Коха. Микроорганизмы высевали на среды с содержанием соли 250 г/л, на которых, как правило, лучше растут такие виды как *Halomonas utahensis* и *Halobacterium salinarum*; а также на среды с пониженным содержанием соли (9 г/л и 50 г/л) для оценки количества микроорганизмов *Thalassobacillus devorans* и *Bacillus licheniformis*.

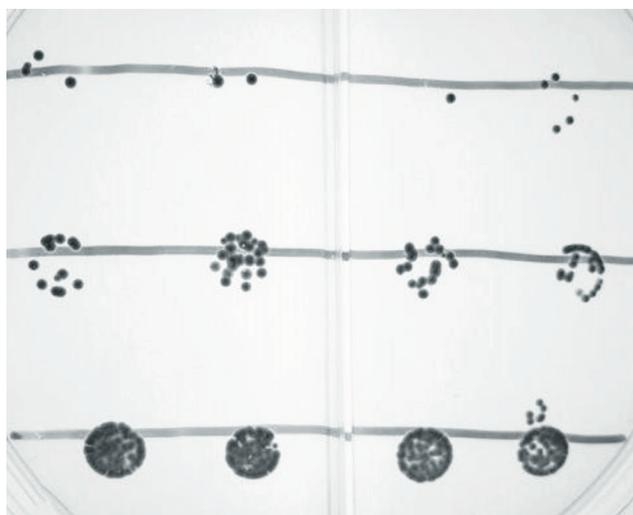


Рис. 1. Колонии *Halomonas utahensis* и *Thalassobacillus devorans* после их совместного культивирования

Наибольшее количество умеренно галофильных микроорганизмов *Thalassobacillus devorans* выросло при их совместном культивировании с *Halomonas utahensis* на 3–4 день после засева, а затем их рост подавляли высокогалотолерантные бактерии *Halomonas utahensis*. Похожие результаты были получены при совместном культивиро-

вании бактерий *Bacillus licheniformis* с галофильными археями. При совместном культивировании галофильных архей и бактерий также наблюдалось более полное усвоение субстрата.

Исследована возможность вторичного роста *Thalassobacillus devorans* и *Bacillus licheniformis* на чашках Петри при совместном культивировании с экстремально галофильными археями и высокогалотолерантными бактериями спустя несколько недель после засева. В случае *Thalassobacillus devorans* действительно наблюдался вторичный рост, что может быть обусловлено синтезом экстремальными галофилами веществ, выступающих в роли осмопротекторов, способствующих росту умеренно галофильных культур и их адаптации к гиперсоленным средам.

### Список литературы:

1. Яковлева А. К., Канарская З. А., Канарский А. В. Перспективы использования галофильных и галотолерантных микроорганизмов в биотехнологии // Вестник Казанского технологического университета. 2017. – Т. 20. – №. 8. – С. 147–151.
2. Ибрахим И. М. и др. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы-продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18. – №. 3. – С. 345–353.
3. Çağlayan P. et al. Screening of industrially important enzymes produced by moderately halophilic bacteria isolated from salted sheep skins of diverse origin // Journal of the American Leather Chemists Association. – 2017. – Т. 112.
4. Селиванова Е. А., Немцева Н. В. Антиоксидантные и антибактериальные свойства экстремально галофильных микроорганизмов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – №. 13 (174). – С. 96–99.

## РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ДЛИТЕЛЬНЫМ СРОКОМ ХРАНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЕЛЕЙ

О.А. Галуза<sup>53, 54</sup>, Г.И. Эль-Регистан<sup>55</sup>, Н.А. Коротков<sup>56</sup>, Ю.А. Николаев<sup>57</sup>

Одной из важнейших отраслей пищевой биотехнологии является производство заквасок (биопрепаратов молочнокислых бактерий (МКБ)), которая составляет 8.8% оборота биотехнологического рынка в России. Несмотря на такую значимость для молочной отрасли, порядка 80–90% заквасочных культур в России составлял импорт, главные поставщики которого расположены в странах Европейского союза. Введение санкций, нарушение логистических цепочек и нестабильная ситуация на рынке привели к тому, что многие предприятия, широко применявшие до недавнего времени импортные биопрепараты, переходят на самостоятельное изготовление или закупку отечественных заквасок. Однако помимо проблем с разработкой и производством биопрепаратов, актуальной является и сложность сохранения технологических свойств МКБ, изменения которых способны привести к возникновению дефектов молочнокислой продукции. Для биопрепаратов МКБ характерна высокая скорость гибели клеток, потеря активности, генетическая нестабильность штаммов, которая зачастую связана с горизонтальным переносом.

В связи с этой ситуацией, образовавшейся на российском рынке, остро встаёт вопрос о создании новых подходов в производстве биопрепаратов с МКБ, а также подходящих условий их хранения и эксплуатации, поскольку известно, что сроки годности таких препаратов ограничены, и для поддержания оптимальных условий хранения и транспортировки необходимо обеспечить производство холодильными камерами, рефрижераторами, датчиками и системами управления, что требует дополнительных вложений и увеличений ежемесячных затрат предприятия.

Все эти факторы обуславливают развитие интереса и актуализации научных исследований в сфере поиска и разработки новых способов продления жизнеспособности МКБ, а также оптимизации процесса хранения молочнокислой продукции. Одним из эффективных методов сохранения жизнеспособности является иммобилизация

<sup>53</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>54</sup> ООО «Бавар+», Москва, olesya\_galuza@mail.ru

<sup>55</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>56</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

<sup>57</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

клеток, в том числе – в гели. Это состояние аналогично тому, когда клетки пребывают в составе биоплёнок, что позволяет популяции сохранять свою жизнеспособность и активность.

Целью данной работы является поиск новых способов сохранения жизнеспособности МКБ, используемых в качестве биопрепаратов, и оценка воздействия разных стрессовых факторов на их выживаемость при иммобилизации в силанольно-гуматные гели (СГГ).

Объект исследования – МКБ *Enterococcus faecium* M3185. Культуру выращивали в жидкой питательной среде LB. Иммобилизацию клеток *E. faecium* стационарной фазы роста осуществляли в гели: 1) 5% и 10% желатиновый гель; 2) 1% гели из камедей; 3) СГГ из препарата гуматов «Фульвигрейн Классик», (3-аминопропил)триэтоксисилана и органических кислот. Количество жизнеспособных клеток (как титр колониеобразующих единиц, КОЕ) определяли высевом десятичных разведений на плотные среды (микрометодом) в течение всего времени хранения.

Ранее было показано, что при иммобилизации *E. faecium* в желатиновые гели с концентрацией 50 и 100 г/л доля жизнеспособных клеток сохранялась на протяжении двух месяцев на уровне 34 и 37% соответственно, от исходного титра КОЕ, что в 4 раза превышает показатель в контрольном нестабилизированном образце. При иммобилизации клеток бактерий *E. faecium* в гели из камедей и последующей инкубации в течение двух месяцев наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась в геллановой, гуаровой и ксантановой камедях. В геллановой камеди титр КОЕ был в 1.5 раза выше, чем в контроле, в гуаровой – в 2.4 раза, в ксантановой – в 2 раза. Полисахариды могут быть источниками питания для бактерий, что способствует пролонгированию их жизнеспособности. При иммобилизации культуры *E. faecium* в силанольно-гуматные гели и последующем инкубировании в течение двух месяцев наибольшее число жизнеспособных клеток сохраняется в гелях с добавлением аскорбиновой, яблочной и молочной кислоты. Их доля была, соответственно, в 63.3; 20.7 и 33.6 раз выше, чем в контрольном варианте. Бактерии способны длительно сохранять свою жизнеспособность в СГГ благодаря образованию биоплёночного фенотипа, возможности использовать органические кислоты в качестве источников энергии и снижению концентрации факторов автолиза. Полученные результаты являются основой нового подхода к повышению количества жизнеспособных клеток МКБ при их длительном хранении с помощью иммобилизации их в органические гели (желатиновые и камедевые) и гели смешанного состава (СГГ).

Для использования в практической деятельности новых технологий (хранения МКБ в СГГ) необходимо определить стрессоры (негативные факторы, действующие в процессе хранения продукции), от которых эти гели защищают (или не защищают) клетки МКБ. Установлено, что СГГ эффективно защищает клетки МКБ от гибели при длительном хранении при температурах 4 °С и 25 °С, влажности 40, 50 и 99%, при интенсивном освещении, а также при доступе кислорода воздуха. При хранении МКБ, иммобилизо-

ванных в СГГ, при температуре 4 °С и 25 °С доля жизнеспособных клеток от их исходного количества составила 58% и 50%, соответственно, что выше, чем в контрольных образцах в 7.1 и 2.6 раза. Хранение культуры при влажности 40, 50 и 99% показало, что доля жизнеспособных клеток составила 33%, 51% и 43%, что было выше, чем в контрольном образце в 1.9, 2.8 и 14.3 раза. При интенсивном освещении доля жизнеспособных клеток МКБ в СГГ была выше, чем в контроле в 3953 раза, а при доступе кислорода воздуха – в 28 раз.

В целях оптимизации затрат на производство биопрепаратов с СГГ и увеличения их протекторного эффекта, исследовано влияние состава среды роста и хранения МКБ на их выживаемость в гелях. Показано, что при инкубации в течение месяца в СГГ бактерий, выращенных в обезжиренном молоке и подсырной солёной сыворотке, жизнеспособность клеток сохраняется на уровне 60–128%, что в 1500 раз больше, чем в контрольном, нестабилизированном образце. А при хранении бактерий в СГГ, выращенных в жидкой среде LB, доля жизнеспособных клеток составила 70%, что в 40 раз больше, чем в контроле. Это объясняется тем, что в обезжиренном молоке и подсырной сыворотке содержится больше питательных элементов и факторов роста, необходимых для МКБ, чем в среде LB.

Одним из важнейших преимуществ геля является способность сохранения жизнеспособных иммобилизованных клеток МКБ в течение длительного срока в условиях, не требующих специальных затрат на их поддержание, а именно – комнатной температуры (18-25 °С), влажности (40–90%), рассеянного освещения. Это делает хранение МКБ в СГГ экономически конкурентноспособным и привлекательным для производителей молочнокислой продукции и биопрепаратов. Использование в качестве среды роста бактерий подсырной солёной сыворотки позволит сохранять титр жизнеспособных клеток на высоком уровне, а также удешевит затраты на сырьё в 5 раз по сравнению с применением молока. Эти факторы способствуют расширению области применения вторичного молочного сырья.

*Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 24-24-20062  
и компании ООО «Бавар+».*

# ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ГЕНОТИПОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *L. MONOCYTOGENES* КАК ОТРАЖЕНИЕ ТРЕНДОВ В ПИЩЕВОЙ ИНДУСТРИИ

Е.Р. Гончарова<sup>58</sup>, М.С. Самарина<sup>59</sup>, М.С. Кунда<sup>60</sup>, Н.Н. Рыжова<sup>61</sup>,  
Е.И. Ермолова<sup>62</sup>, Т.И. Карпова<sup>63</sup>, Е.А. Климова<sup>64</sup>,  
И.С. Тартаковский<sup>65</sup>, О.Л. Воронина<sup>66</sup>

**Введение.** *Listeria monocytogenes* – убиквитарная, психрофильная бактерия, являющаяся возбудителем пищевых инфекций. Вспышки листериоза, вызванные употреблением контаминированных продуктов, как и спорадические случаи, находятся на контроле Роспотребнадзора, CDC, ECDC и подлежат регистрации с 1980-х гг. Из двух форм листериоза: гастроэнтерит и инвазивный листериоз (ИЛ) – последний является наиболее тяжелым и в 30% случаях, по данным ВОЗ, приводит к смертельным исходам. ИЛ подвержены лица с иммуносупрессией различного генеза, в том числе вызванной вирусными инфекциями, как сезонными, так и хроническими. В соответствии с клиническими проявлениями пациентов с ИЛ подразделяют на две когорты: перинатальный листериоз (ПЛ) и менингит–септицемия (МС). В московском регионе с 2018 г. с разрешения ДЗ Москвы проводится многоцентровой мониторинг ИЛ, охвативший период пандемии COVID-19 (Cov) и период после пандемии (PCov). Мониторинг включает молекулярно-генетический анализ изолятов *L. monocytogenes*, позволяющий определить генотип (ST, sequence type) в контексте генов MLST (Multi Locus Sequence Typing), принадлежность к одной из четырех филогенетических групп (PL), из которых листерии PLI и PLII вызывают подавляющее большинство клинических случаев. Результаты полногеномного секвенирования расширяют MLST до корового генома (cgMLST), включающего 1748 локусов. Сравнение коровых геномов дает представление об эпиде-

<sup>58</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>59</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>60</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>61</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>62</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>63</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>64</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>65</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>66</sup> ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

мической связи изолятов, относимых к одной вспышке при разнице в cgMLST не более, чем в 7 локусах. Данные мониторинга показали, что клинические и пищевые изоляты, выделенные в Сов, обогатились представителями новых генотипов, ранее не встречавшихся на территории РФ, а случаи ИЛ стали вызывать *L. monocytogenes* таких ST, которые ранее выявляли только у пищевых изолятов. Эти данные стали косвенным свидетельством влияния Сов на тенденции в пищевой индустрии: расширение ассортимента полуфабрикатов и готовых к употреблению блюд, развитие системы доставки, изменение структуры поставщиков и, соответственно логистики. Эти тенденции развиваются и в РСов.

**Целью** нашего исследования стало сравнение клинических изолятов *L. monocytogenes*, выделенных в периоды Сов и РСов для выявления влияния изменений в пищевой индустрии на привнесение листерий новых генотипов.

**Материалы и методы.** Клинические изоляты *L. monocytogenes*, выделенные в лабораториях 10-ти клиник Москвы, анализировали с помощью MLST и выборочно посредством WGS на платформе Illumina. Анализ данных MLST и cgMLST выполняли, используя BIGSdb-Lm (Bacterial Isolate Genome Sequence Database for *L. monocytogenes*, <https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>). Для сборки геномов применяли CLC Genomics Workbench 21 и SPAdes v.3.13.0 0 (St. Petersburg genome assembler, Russia, URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Аннотацию геномов выполняли с помощью сервера RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology, <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) и NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). Мобильные генетические элементы идентифицировали с помощью MobileElementFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>). Сравнение плазмид проводили с применением «CLC Genomics Workbench v. 21.0.1» с плагином «Whole Genome Alignment v. 21.0». Данные депонировали в BIGSdb-Lm и GenBank (биопроект PRJNA605697).

**Результаты исследования.** 52 клинических изолята, выделенных в Сов (март 2020 г. – апрель 2023 г.), относились к 19 ST, 46 изолятов периода РСов (май 2023 г. – июль 2024 г.) – к 16 ST. Несмотря на то, что доли более вирулентных изолятов PLI, так же как и коэффициенты разнообразия (H) генотипов PLI, были практически одинаковыми в периоды Сов и РСов (37%, H=2,2 и 35%, H=2,2), в структуре изолятов PLI произошли изменения. Изоляты Сов PLI относились к серогруппе 4b и преимущественно были гипервирулентными, поскольку принадлежали клональным комплексам (Clonal Complex CC) 1, 4, 6. Среди изолятов РСов гипервирулентные составили 56%, а 44% относились к серогруппе 1/2b. Следует отметить, что *L. monocytogenes* CC4 выявили впервые именно в Сов, а изоляты РСов CC87 стали новыми среди клинических изолятов Московского региона и начали доминировать. Изоляты ST87 различались профилями генов интерналинов, необходимых для инвазии. Анализ cgMLST изолятов ST87 показал отличия по 14–22 локусам, что свидетельствует о наличии различных источников инфицирования пациентов. В период Сов изоляты как ST4 (PLI), так и ST21, ST425

(PLII), выделенные от разных пациентов, имели минимальные отличия в cgMLST, что доказывало эпидемическая связь между изолятами одного генотипа.

Генотипы гиповирулентных изолятов PLII были более разнообразными: в Сов  $H=3,5$ , а в РСов показатель разнообразия несколько снизился ( $H=3,1$ ). Общими для двух периодов стали листерии ST7, ST8, ST14, ST21, ST29, ST391 и ST451. *L. monocytogenes* ST451, впервые выявленные в Сов, стали доминировать в РСов. В этот же период новыми в выборке клинических стали изоляты ST111 и ST504, ранее выделенные только из окружающей среды и продуктов питания, соответственно. Изоляты ST378 (CC19) были выявлены впервые.

Данные WGS позволяют анализировать не только гены хромосомы, но и репликационных плазмид. В клинических изолятах *L. monocytogenes* плазмиды достаточно редки, но в период Сов (2021-2022 гг.) плазмиды групп репликации G1 и G2 выявили в геномах изолятов ST20, ST425, ST121 и ST8. В 2023 – начале 2024 г. изоляты с плазмидами отсутствовали, однако в мае 2024 в изоляте CC7, выделенном от пациента когорты ПЛ, обнаружили плазмиду G1, практически идентичную ранее зарегистрированным плазмидам листерий ST20 и ST425. Это первый случай наличия плазмиды в изолятах аутохтонного CC7 в РФ.

Изменения в РСов произошли и в характеристиках выборки пациентов с ИЛ. Для пациентов когорты МС наметилась тенденция к снижению доли более молодых (младше 59 лет) пациентов (30%), сократилась доля смертельных исходов с 59 до 20%. Отметим, что с мая по июль 2024 впервые с начала мониторинга среди клинических изолятов преобладали более вирулентные – генотипов PLI, что косвенно свидетельствует о положительных изменениях в иммунном статусе пациентов.

**Обсуждение.** Приток *L. monocytogenes* новых генотипов, начавшийся в Сов, продолжился в РСов. Если в Сов изоляты новых генотипов соответствовали циркулирующим в странах Европы, преимущественно восточной, то в РСов изоляты новых генотипов (ST87, ST378) являются характерными для стран Азии. Две эпидемические вспышки в Испании, вызванные *L. monocytogenes* ST87, лишь подтверждают завозной характер источника инфицирования с учетом географического положения и экономических связей этой страны. Полученные данные подтверждают, что *L. monocytogenes*, вызывающая ИЛ, может служить индикатором изменений в пищевой индустрии, а выявленные новинки – сигналами к проверке продукции тех стран, где распространены листерии обнаруженных генотипов.

# ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОСУРФАКТАНТОВ ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

А.С. Гордеев<sup>67</sup>, Л.Р. Бикташева<sup>68</sup>, А.А. Кириченко<sup>69</sup>

Избыточное накопление отходов требует решений для их переработки и повторного использования, в том числе с помощью биосурфактантов (БС) – производимых микроорганизмами поверхностно-активных веществ, снижающих поверхностное натяжение, эмульгирующих нефть и применяющихся в очистке сточных вод и производстве биофунгицидов. Получение БС из углеродсодержащих субстратов, включая органические отходы, позволяет сократить объемы отходов. Известно, что маслосодержащие и пищевые отходы, а также загрязненные почвы являются источниками микроорганизмов, способных к синтезу БС. В ходе исследования было выделено 37 штаммов, включая *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Sphingomonas*, продемонстрировавших потенциал для производства БС.

На начальном этапе исследования был проведен отбор органических отходов. Маслосодержащие, пищевые и сельскохозяйственные отходы являются источниками микроорганизмов-продуцентов БС. Были отобраны почвы, загрязненные моторными маслами и нефтепродуктами. Среди пищевых отходов выделялись отработанное масло для жарки (2679 тонн в 2022 году) и картофельные очистки (23686 тонн). Из сельскохозяйственных отходов были выделены жмых рапса (1195 тонн) и жмых подсолнечника (123151 тонн), а также загрязненные почвы (1351 тонна) и отходы жирловушек (35283,7 тонны) и нефтеловушек (58052,5 тонны) со станции водоочистки.

Из полученных отходов были выделены изоляты микроорганизмов. Для 37 штаммов определена видовая принадлежность после секвенирования по Сэнгеру: *Enterobacter* sp. 1pp, *Enterobacter ludwigii* 2pp, 3pp, 4pp, *Enterobacter ludwigii* 5pp, *Pantoea* sp. 1rc, *Proteus mirabilis* 1gt, *Bacillus aerophilus* 2gt, *Citrobacter freundii* 1s, *Sphingomonas echinoides* 2s, *Sphingomonas* sp. 1wfo, *Sphingomonas* sp. 2wfo, *Pseudomonas stutzeri* 2wfo, *Sphingomonas* sp. 4wfo, *Sphingomonas echinoides* 5wfo, *Sphingomonas* sp. 1sc, *Sphingomonas* sp. 2sc, *Sphingomonas* sp. 4sc, *Sphingomonas* sp. 5sc, *Peribacillus frigoritolerans* 1mo, *Sphingomonas echinoides* 2mo, *Nocardiopsis* sp. 3mo, *Bacillus gibsonii* 4mo, *Ochrobactrum* sp. 5mo, *Shouchella gibsonii* 6mo, *Sphingomonas* sp. 7mo, *Bacillus*

<sup>67</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>68</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>69</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

*tequilensis* 1os, *Bacillus toyonensis* 2os, *Bacillus amyloliquefaciens* 3os, *Staphylococcus* sp. 4os, *Bacillus cereus* 5os, *Sphingomonas* sp. 6os, *Sphingomonas* sp. 7os, *Sphingomonas* sp. 8os, *Sphingomonas* sp. 9os, 3sc, 10os.

В ходе скрининга было установлено, что наибольшее количество штаммов выделено из нефтезагрязнённых почв (НП), в то время как наименьшее число изолятов получено из отходов жмыха рапса. Всего 16 штаммов были идентифицированы до вида, 17 – до родового уровня, 4 изолята не удалось классифицировать. Примечательно, что 10 штаммов принадлежали роду *Sphingomonas*, а 6 – роду *Bacillus*. Из картофельных очисток было получено 5 штаммов, большинство из которых относились к роду *Enterobacter*, что соответствует типичному микробному сообществу отходов. Род *Sphingomonas* широко распространён в природе и характеризуется способностью к деградации углеводов.

Минимальное количество штаммов было получено из жмыха рапса, представленного единственным изолятом *Pantoea* sp. 1rc, который включает разнообразные виды, выделенные из различных сред. Оценка способности снижать поверхностное натяжение проводилась на среде с глицерином, минеральной с картофельными очистками, отработанным фритюрным маслом и жмыхом подсолнечника, а также жмыхом рапса.

Так, исследования по выделению продуцентов БС из отходов продемонстрировали потенциал использования этих субстратов. Выделенные штаммы показали высокую эффективность в снижении поверхностного натяжения, подтверждая их пригодность для биоремедиации. Эксперимент с БС, произведенным штаммом *Nocardiosis* sp. 3mo, показал значительное снижение содержания нефтепродуктов в загрязненной почве.

Известно, что показателем высоких поверхностно-активных свойств может являться значение силы снижения поверхностного натяжения около 40 мН/м. Следовательно, наиболее эффективными штаммами, обладающими способностями к снижению поверхностного натяжения стало 12 изолятов – *Sphingomonas* sp. 2wfo, 3sc, *Sphingomonas* sp. 5sc, *Peribacillus frigoritolerans* 1mo, *Sphingomonas echinoides* 2mo, *Nocardiosis* sp. 3mo, *Ochrobactrum* sp. 5mo, *Shouchella gibsonii* 6mo, *Bacillus tequilensis* 1os, *Bacillus toyonensis* 2os, *Bacillus amyloliquefaciens* 3os, *Bacillus cereus* 5os. Среди них присутствуют как известные производители БС, такие как представители рода *Peribacillus* sp. позволяющие снижать поверхностную активность до 25,9–27,6 мН/м, и рода *Ochrobactrum* sp., выделенный из загрязненной моторным маслом почвы, позволяющий снизить поверхностное натяжение культуральной жидкости с 70 до 30,8 мН/м.

На следующем этапе эксперимента была проведена биоремедиация НП с использованием штамма *Nocardiosis* sp., известного своей эффективностью в этих процессах. Оценивалось воздействие БС в двух концентрациях на биodeградацию нефтепродуктов аборигенным микробным сообществом. Эксперимент включал: НП; почва с аэрацией; почва с БС в концентрации 0,05% (0,5 г/кг); почва с БС в концентрации 0,1% (1 г/кг); контроль – чистая почва. Все образцы были контаминированы нефтью в концентрации 2 г/кг.

Анализ содержания нефтепродуктов методом SARA (таблица 2) показал, что в НП без биоремедиации снижение составило 2% от начального уровня, вероятно, за счет испарения легких фракций. Аэрация и полив привели к снижению на 5% благодаря деятельности аборигенного микробного сообщества. Добавление БС в концентрациях 0,5 и 1 г/кг снизило содержание нефтепродуктов на 29% и 35% соответственно. Влияние БС на скорость разложения увеличивается благодаря эмульгированию и улучшению доступности для микроорганизмов. Анализ легких фракций нефти с помощью ИК-спектроскопии показал снижение их количества в образцах НП и почвы с аэрацией на 65% и 68%, а в образцах с БС – на 86% и 83% (таблица 1).

Таблица 1.

## Степень биodeградации нефтепродуктов в процессе биоремедиации

Образец	Степень биodeградации нефтепродуктов, %	
	Тотальное содержание нефтепродуктов, оцененное методом SARA	ИК-спектроскопия
НП	2.00 ± 0.06	65.29 ± 2.01
НП (с аэрацией)	5.00 ± 0.12	68.19 ± 2.73
БС (500 мг/кг)	29.44 ± 0.88	86.58 ± 3.46
БС (1 г/кг)	35.00 ± 1.24	83.49 ± 3.34

Таким образом, проведенные исследования по выделению микроорганизмов-продуцентов БС из органических отходов Республики Татарстан продемонстрировали значительный потенциал использования этих отходов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв. Выделенные штаммы микроорганизмов продемонстрировали высокую эффективность в снижении поверхностного натяжения, что подтверждает их пригодность для применения в процессах биоремедиации. Эксперимент, проведенный с использованием БС, произведенного штаммом *Nocardiosis* sp. Это, показал значительное снижение содержания нефтепродуктов в загрязненной почве, что открывает новые возможности для экологически безопасного восстановления загрязненных территорий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского Научного Фонда, грант № 23-24-00611.*

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА *ROSEATELES AMYLOVORANS* bsSlp3-1<sup>T</sup>: ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

Д.Е. Гуляева<sup>70</sup>, А.В. Сидоренко<sup>71</sup>

Род *Roseateles* относится к семейству *Comamonadaceae*, классу *Betaproteobacteria*, отряду *Pseudomonadota*. Бактерии данного рода широко распространены в различных биотопах, включая пресноводные водоемы, донные отложения, почву и корни растений, и обладают рядом биотехнологически ценных свойств. В частности, представители типового вида *Roseateles depolymerans* способны к аноксигенному аэробному фотосинтезу, продукции каротиноидов, деструкции полигексаметилен карбоната и ряда других биоразлагаемых пластиков [1, 2].

Цель данной работы – оценка биотехнологического потенциала штамма *Roseateles amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup>, выделенного из Слепянской водной системы, на основе комплексного исследования физиолого-биохимических свойств и функционального анализа генома.

Геном *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> (номер доступа в ГенБанке НЦБИ CP104562) представлен кольцевой двухцепочечной ДНК размером 6 289 366 п.н. с содержанием ГЦ-пар 66,8%. В геноме обнаружено 5200 генов, включая 5026 белок-кодирующих последовательностей, 82 последовательности, кодирующие РНК, и 92 псевдогена. Плотность кодирования белков составила 87,2 %.

Штамм *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup>, вероятно, способен к аноксигенному фотосинтезу, так как в его геноме выявлен кластер фотосинтетических генов. Данный кластер включает опероны *puf* и *puh* (*pufA*, *pufB*, *pufC*, *pufM*, *pufL*, *puhA*, *puhB*, *puhC*, *puhE*), кодирующие белки фотосинтетических реакционных центров и светособирающего комплекса I; гены биосинтеза бактериохлорофилла *a* (*bchB*, *bchC*, *bchF*, *bchI*, *bchL*, *bchM*, *bchY*, *bchZ*, *chlG*); *crt*-оперон, кодирующий ферменты биосинтеза каротиноидов спириллоксантина и сфероидена (*crtC*, *crtD*, *crtF*, *crtI*). Кроме того, обнаружены генетические локусы, кодирующие ферменты фиксации углерода, связанные с САМ-фотосинтезом (N4261\_18400, N4261\_10075, N4261\_03340) и циклом С4-дикарбоновых кислот (*pcc*, N4261\_03340, N4261\_24560, N4261\_10075). На фенотипическом уровне окрашивание колоний *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> в розовый цвет отмечено при культивировании на минимальных средах в присутствии пирувата натрия, гидролизата казена и глюкозы, что

<sup>70</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>71</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

косвенно свидетельствует о биосинтезе штаммом фотосинтетических пигментов в условиях недостатка питательных веществ.

Исследуемый штамм может синтезировать различные низкомолекулярные соединения. В его геноме присутствуют гены, кодирующие ферменты полных метаболических путей биосинтеза аминокислот (серина, аланина, треонина, глицина, цистеина, метионина, валина, лейцина, изолейцина, лизина, орнитина, аргинина, гистидина, триптофана, фенилаланина, тирозина, глутатиона), витаминов и кофакторов (тиамина, рибофлавина, пиридоксина, кобаламина, коэнзима-А, биотина, липоевой, тетрагидрофолевой и фолиевой кислот).

Штамм *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> потенциально способен гидролизовать широкий спектр органических субстратов. В его геноме обнаружены гены, кодирующие ферменты гидролиза крахмала и гликогена – альфа-амилазу (N4261\_00795), 4-альфа-глюканотрансферазу (*malQ*), фосфорилазу гликогена/крахмала/альфа-глюканов (N4261\_15000), альфа-1,6-глюканогидролазу гликогена (*glgX*); разложения целлюлозы – эндоглюканазы (N4261\_12805, N4261\_12980, N4261\_13030, N4261\_13115, N4261\_23530) и бета-глюкозидазы (N4261\_12880, N4261\_13140, N4261\_24500); деградации хитина и ксилана – хитиназы (N4261\_09755, N4261\_09760, N4261\_13195), альфа- и бета-ксилозидазы (N4261\_12800 и N4261\_12815, соответственно). Кроме того, выявлены генетические детерминанты ферментов, эстеразы (N4261\_RS14800) и кутиназы (N4261\_RS13160), катализирующих деструкцию биоразлагаемых пластиков. При изучении ферментативной активности штамма *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> с помощью чашечных методов выявлена продукция амилаз, протеаз и липаз (диаметр зоны гидролиза крахмала – 32–36 мм, казеина – 25–28 мм, твина-20, 60 и 80 – 33–35, 33 и 35–37 мм, соответственно), но не целлюлаз. Показано, что исследуемый штамм способен к деструкции поликапролактона: через три недели глубинного культивирования в среде R2A в присутствии пленок данного биопластика наблюдалось их полное разложение.

В геноме *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> найдены гены системы секреции II типа (*gspD*, *gspF*, *gspG*, *gspH*, *gspI*, *gspJ*, *gspK*, *gspE*) и VI типа (*vrgG*, *hcp*, *dotU*, *tssB*, *tssC*, *tssE*, *tssF*, *tssG*, *tssH*, *tssJ*, *tssK*, *tssM*). Данные системы могут быть потенциально связаны с секрецией ферментов, токсинов и эффекторных молекул. Кроме того, обнаружены гены токсинов мРНК-интерфераз *relE* (N4261\_10060), *yafQ* (N4261\_01695), *higB* (N4261\_21380) и серин/треонин-протеинкиназа *hipA* (N4261\_01025, N4261\_20910). Наличие перечисленных генетических детерминант может рассматриваться как фактор антагонизма *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> по отношению к другим бактериям, обитающим в водной среде. Исследование антагонистической активности *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> к бактериальным культурам, выделенным из Слепянской водной системы, показало, что данный штамм подавляет рост культур *Flavobacterium piscis* БИМ В-1712, *Comamonas* sp. БИМ В-1734, *Delftia acidovorans* БИМ В-1761 (зоны задержки роста диаметром 4–8 мм), но не оказывает ингибирующего действия на культуры *Klebsiella terrigena*

БИМ В-1721, *Pseudomonas plecoglossicida* БИМ В-1722, *Pseudomonas protegens* БИМ В-1738, *Aeromonas veronii* БИМ В-1756.

В геноме *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> найдены гены CRISPR-Cas системы подтипа I-E, обеспечивающей защиту от бактериофагов: эндонуклеаза *cas1e* и эндорибонуклеаза *cas2e*, хеликаза *cas3* и гены белков *casA* (*cse1*), *casB* (*cse2*), *cas5e*, *cas6e*, *cas7e*, повторяющийся регион длиной 5956 п.н. и системы рестрикции-модификации типа I (*hsdM*, *hsdR*, *hsdS*). При этом геном исследуемого штамма содержит четыре последовательности профагов, три из которых неполные, одна – неподтвержденная. Отсутствие в геноме *R. amylovorans* bsSlp3-1<sup>T</sup> интактных профагов может быть связано с действием систем противофаговой защиты.

### Список литературы:

1. Suyama T. et al. *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the  $\beta$ -subclass of the Proteobacteria // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1999. – Vol. 49, № 2. – P. 449–457.
2. Shah A. A. et al. Purification and properties of novel aliphatic-aromatic co-polyesters degrading enzymes from newly isolated *Roseateles depolymerans* strain TB-87 // Polymer degradation and stability. – 2013. – Vol. 98, № 2. – P. 609–618.

# АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ВОД, В ТОМ ЧИСЛЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКОВ НЕЦЕНТРАЛИЗОВАННОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ НАСЕЛЕНИЯ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ВЕРХНЕВОЛЖСКОГО БАССЕЙНА

С.С. Гусев<sup>72</sup>, Е.В. Сорокина<sup>73</sup>, Л.Ф. Ткебучава<sup>74</sup>

На сегодняшний день используются различные подходы для оценки качества воды. Широкое распространение получили биологические методы оценки, как более быстрые и менее затратные. На биологических станциях не всегда удается очистить сточные воды до необходимых параметров: в воде могут оставаться микроорганизмы, компоненты средств гигиены человека, бытовой химии, фармацевтических препаратов и проч. Они представляют опасность, обладая патогенным, канцерогенным или мутагенным действием. Для очистки воды используют хлор, гипохлорит натрия, диоксид хлора, озон, перекись водорода, реактив Фентона и др. Все эти факторы могут негативно сказываться на качестве вод.

Попадающие в воду химические вещества могут негативно влиять на человека и окружающую среду, и эти последствия могут отдаленно проявляться во времени. Высокие концентрации этих веществ способны нарушать метаболические процессы, протекающие в клетке и влиять на репродукцию клеток.

Целью нашей работы является проведение экомониторинга для оценки микробиологических и химических показателей качества воды. Как объект изучения мы выбрали водные ресурсы на территории Верхневолжского бассейна. Эта территория традиционно считается экологически чистым районом и зачастую вода из расположенных поблизости водных объектов используется местным населением в качестве источников нецентрализованного питьевого водоснабжения. В настоящее время у населения сложилось мнение о том, что самая чистая, полезная и безопасная вода из колодцев, ключей и родников. В подавляющем большинстве случаев подобное суждение является заблуждением. Очень часто источники нецентрализованного водоснабжения могут

<sup>72</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва

<sup>73</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва

<sup>74</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва

быть непригодны и даже опасны для использования человеком. Поэтому представляется важным определения качества вод по необходимым показателям и соотнесение полученным результатов действующим в настоящее время нормативным документам.

В нашей работе методом биотестирования на модели бактериальной люминесценции были исследованы характеристики четырёх природных образцов воды: 1 – родник, находящийся в непосредственной близости от реки Волги и используемый для питьевого водоснабжения местным населением, 2 – вода истока Волги, 3 – вода реки Волги в рекреационной зоне, 4 – самая нижняя точка по течению, около плотины, в месте предполагаемого сброса сточных вод.

Оценку качества воды, которую отбирали в летний сезон, проводили с помощью бактериального люминесцентного теста на бактериях *Escherichia coli* K12 TGI со светящимся фенотипом (биосенсор «Эколюм»). Регистрировали изменения люминесценции бактерий в отобранных образцах воды на люменометре LKB (Германия). При биотестировании использовали лиофильно высушенные клетки бактерий после регидратации в течение 30 мин в 10 мл стерильной дистиллированной воды (рН 7,4). Индекс токсичности ( $I_t$ ) во времени взаимодействия биосенсора с исследуемым образцом воды определялся по формуле:  $I_t = 100 \cdot (I_k - I) / I_k$ , где  $I_k$  и  $I$  — интенсивность свечения контроля и опыта. Оценку токсичности классифицировали по трём группам: величина  $I_t < 20$  — образец нетоксичен;  $I_t > 20$ , но  $< 50$  — образец токсичен;  $I_t > 50$  — образец очень токсичен. Иногда наблюдали стимуляцию свечения тест-организма, т.е. величина  $I_t$  с отрицательным знаком. Показателя индекса токсичности были в пределах нормы в образце 3 (пляж) и 4 (нижняя точка бассейна)  $I_t = 5$  и  $I_t = 11$  соответственно. Самый высокий показатель токсичности был образец 1 (родник)  $I_t = 28$ , что выше нормы, а в образце 2  $I_t = -14$ . Многие исследователи принимают показатели стимуляции люминесценции биотеста как токсическое действие ксенобиотиков незначимым. Стимуляция свечения может быть связана и с механизмом действия веществ высокой липофильности, в то время как гидрофильные вещества преимущественно вызывают эффект тушения люминесценции. При этом стимуляция и ингибирование свечения бактерий является показателем проявления биологической активности. Понятие гормезиса, когда различные вещества в малой концентрации, действуя на некоторые функции организма, вызывают их стимуляцию. Считается, что в зависимости от концентрации химических веществ в водных образцах, микроорганизмы, входящие в состав биотеста, могут активировать адаптационные механизмы регуляции на уровне генома, в результате которых, бактерии приобретают устойчивость, становятся способны выживать, в условиях стресса.

Определение рН водных образцов осуществляли потенциометрически. Образцы отличались по данному показателю незначительно. Образцы 3 и 4 с показателями рН близкими к 7. Образец 1 более щелочной, его показатель был 7,8. Образец 2 более кислый с показателем 6,4.

Во всех этих образцах также проанализировали микробиологические характеристики и общее микробное число. Посев образцов осуществляли на питательные

среды, а именно на мясопептонный агар и на селективную среду Эндо. Наносили по поверхности агара по 0,1 мкл и получили следующие результаты КОЕ, результаты представлены в таблице.

*Таблица.*

Результаты КОЕ на 7 сутки роста в кл/мл.

Образец	Среда МПА	Среда Эндо
1 родник	$4 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^4$
2 исток Волги	$4,2 \cdot 10^4$	$0,5 \cdot 10^3$
3 рекреационная зона	$0,8 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^4$
4 нижняя точка бассейна	$1,2 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$

Методы по определению общего микробного числа в образце уже давно используются в проведении анализа качества воды. Посевы на питательную среду помимо общего количества микроорганизмов могут предоставить общую картину разнообразия микроорганизмов в образце, а среда Эндо используется в целях выделения и дифференциации грамотрицательных микроорганизмов кишечной группы Enterobacteriaceae. Колиформы, попавшие в воду через экскременты животных являются опасными и вызывают острые воспалительные процессы желудочно-кишечного тракта. Если в воде обнаруживаются высокие показатели КОЕ, что указывает на фекальное загрязнение водных образцов. Главный параметр, исследуемый при анализе — количество бактерий в 1 мл. жидкости. Согласно СанПину 1.2.3685-21, данная цифра должна быть равна 100 экз/мл. Превышение указанной концентрации означает загрязнение воды — в таком случае следует немедленно прекратить использование источника. В наших образцах этот показатель был выше нормы. В летний сезон вода в роднике имеет высокие показатели КОЕ, что делает её непригодной для использования. Результаты демонстрируют, что безопасность водных образцов зависит не только от места забора образца, но и от сезонности, которая может влиять на органолептические показатели воды. Биотестирование на основе микроорганизмов со светящимся фенотипом помогает достаточно точно указать какие водные образцы пригодны для питья и жизнедеятельности человека, а какие нет и при каких условиях и когда они безопасны.

В дальнейшем предполагается изучение сезонной динамики (осень/зима/весна) воды из тех же точек забора с целью экологической и санитарной оценки и соотнесение полученных показателей с нормативными документами (СанПин) и показателями экологического благополучия природных вод.

# МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ И ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ПОРЧУ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ: РАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Д.Ю. Данилова<sup>75, 76</sup>, К.В. Кантор<sup>77</sup>, А.В. Сидоренко<sup>78</sup>

Микробиологическая порча пищевых продуктов – распространенная проблема пищевой промышленности, приводящая к большим экономическим потерям, снижению безопасности продуктов питания и увеличению количества пищевых отходов. Примерно в 5–10 % случаев причиной порчи пищевых продуктов является их контаминация мицелиальными и дрожжевыми грибами, сопровождающаяся изменением цвета, появлением неприятного запаха, ухудшением вкусовых качеств, а также накоплением микотоксинов. Изучение видового разнообразия грибов-контаминантов и определение их устойчивости к регулируемым факторам внешней среды (температура, рН, высокие концентрации хлорида натрия, др.) необходимы для разработки эффективных стратегий борьбы с микробиологической порчей продуктов питания.

Охарактеризован видовой состав мицелиальных и дрожжевых грибов пяти образцов сыра и двух образцов творога с признаками микробиологической порчи. В четырех из семи исследуемых продуктов обнаружены микромицеты рода *Penicillium*, в двух – рода *Epicoccum*, представители других родов выявлены в отдельных продуктах. Среди изолятов большую часть составляли грибы рода *Penicillium* (9 изолятов), реже встречались представители родов *Cladosporium* (2 изолята), *Epicoccum* (2 изолята), *Fusarium* (1 изолят), *Didymella* (1 изолят), *Phoma* (1 изолят) и *Geotrichum* (1 изолят), относящиеся к отделу *Ascomycota*. Помимо сумчатых грибов, из исследуемых продуктов выделены два представителя отдела *Mucoromycota* – *Mucor racemosus* (1 изолят) и *Thamnidium elegans* (1 изолят). Дрожжевые грибы, идентифицированные как *Rhodotorula* sp., обнаружены только в одном образце сыра (таблица).

Установлено, что выделенные культуры мицелиальных и дрожжевых грибов способны расти при температуре от 4 до 24 °С с оптимумом 18–24 °С, что позволяет отнести их к психротолерантным микроорганизмам. Кроме того, исследуемые изоляты хорошо росли в широком диапазоне рН среды (от 4,5 до 9,5) и в присутствии высо-

<sup>75</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>76</sup> Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>77</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>78</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ких концентраций хлорида натрия (до 9–12%). Устойчивость к низким температурам, кислой среде и высокому содержанию соли позволяет микромицетам и дрожжам развиваться на поверхности молочных продуктов (в т.ч. твердых сыров) в процессе хранения и вызывать их порчу.

Таблица.

Культуры микроорганизмов, выделенные из исследуемых образцов молочных продуктов с признаками микробиологической порчи

Продукт	Признаки микробиологической порчи	Микроорганизмы – контаминанты
Сыр полутвердый Моцарелла	Присутствие мицелия белого цвета и красных пятен на поверхности продукта	<i>Rhodotorula</i> sp.
		<i>Geotrichum candidum</i>
Сыр «Сулугуни»	Присутствие мицелия различной окраски на поверхности продукта	<i>Cladosporium ramotenellum</i>
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium avenaceum</i>
		<i>Didymella pinodella</i>
		<i>Phoma</i> sp.
		<i>Epicoccum</i> sp.
Сыр полутвердый Классический	Присутствие мицелия различной окраски на поверхности продукта; неприятный запах	<i>Penicillium</i> sp.
Сыр «Тильзитер»	Присутствие мицелия различной окраски на поверхности продукта; неприятный запах	<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Mucor racemosus</i>
Сыр полутвердый	Присутствие мицелия различной окраски на поверхности продукта; неприятный запах	<i>Penicillium</i> sp.
Творог домашний	Присутствие мицелия светло-серого цвета	<i>Thamnidium elegans</i>
		<i>Penicillium</i> sp.
Творог	Присутствие мицелия на поверхности продукта	<i>Epicoccum</i> sp.

Исследовано влияние на рост выделенных культур мицелиальных грибов *S. ramotenellum*, *T. elegans*, *F. avenaceum* и *D. pinodella* сорбата калия (E202), цитрата натрия (E331) и пропионата натрия (E281), используемых в пищевой промышленности в качестве консервантов для предупреждения микробиологической порчи и продления срока годности продуктов питания. Установлено, что наиболее выраженным антифунгальным действием обладал сорбат калия, который в концентрации 0,5 г/л подавлял рост всех тест-культур микромицетов. При этом рН среды (5,0 или 6,0) не влиял на антифунгальную активность консерванта. Наименее эффективным оказался цитрат натрия, добавление которого в питательную среду в концентрации

0,5–2 г/л не подавляло рост исследуемых культур мицелиальных грибов, а в отдельных случаях (*Cl. ramotenellum* при рН 5,0) даже стимулировало его. Влияние пропионата натрия было более штаммоспецифичным. Данный консервант в концентрации 0,5 г/л ингибировал рост *Cl. ramotenellum*, 1 г/л – рост *T. elegans* и *F. avenaceum*. Для всех исследуемых тест-культур более выраженный антифунгальный эффект пропионата натрия отмечен при рН среды 5,0.

Полученные результаты согласуются со сведениями литературы о широком распространении грибов рода *Penicillium* в качестве контаминантов молочных продуктов, а также об устойчивости микромицетов и дрожжей, вызывающих порчу продуктов, к неблагоприятным внешним условиям (низкие температуры, рН, высокие концентрации хлорида натрия). Сорбат калия в концентрации 0,5 г/л и выше может рассматриваться как эффективный антифунгальный агент для предотвращения микробиологической порчи молочных продуктов.

# АКТИНОМИЦЕТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПОЧВ И СОПРЯЖЕННЫХ СУБСТРАТОВ ПРИРОДНЫХ ЗАПОВЕДНИКОВ ВЬЕТНАМА (БАТДАЙШОН, СУАНЛИЕН, ТЭЙЗЯНГ)

Ю.А. Дорченкова<sup>79</sup>, А.А. Белов<sup>80</sup>, В.С. Чепцов<sup>81</sup>, Т.А. Грачева<sup>82</sup>,  
А.Л. Степанов<sup>83</sup>, А.В. Александрова<sup>84</sup>

Актиномицеты представляют собой одну из наиболее значимых групп почвенных микроорганизмов, благодаря своей способности разлагать сложные органические вещества, синтезировать биологически активные соединения и участвовать в круговороте питательных веществ. Они играют ключевую роль в поддержании почвенного плодородия и стабильности экосистем. В природных заповедниках, где минимизировано воздействие человека, изучение актиномицетов особенно важно для понимания природных механизмов поддержания экосистемной устойчивости и биоразнообразия. Природные заповедники Вьетнама, такие как Батдайшон, Суанлиен и Тэйзьянг, представляют собой уникальные экосистемы, обладающие богатым биоразнообразием и отличающиеся разнообразием климатических и геологических условий. Однако почвенные микробные сообщества, включая актиномицеты, остаются малоизученными, несмотря на их значительное влияние на функционирование экосистем. Настоящее исследование направлено на комплексное изучение актиномицетных сообществ почв и сопряженных субстратов в данных заповедниках.

Образцы почвы и растительного опада были отобраны на нескольких участках природных заповедников Батдайшон, Суанлиен и Тэйзьянг. Анализ проводился с целью определения численности актиномицетов, их таксономического разнообразия и эколого-физиологических характеристик. Пробы также включали образцы почвоподобных тел, отобранных из корзинок эпифитного папоротника *Drynaria* sp.. Методом культивирования определялась численность актиномицетов (КОЕ/г).

В природном заповеднике Батдайшон численность актиномицетов в исследованных субстратах варьировала от  $2.0 \times 10^4$  до  $3.4 \times 10^5$  КОЕ/г. Для обоих участков бóльшая числен-

<sup>79</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

<sup>80</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

<sup>81</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

<sup>82</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

<sup>83</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения, Москва

<sup>84</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

ность отмечалась в образцах почвы и превышала численность актиномицетов в образцах листовного опада более чем на порядок. Доминирующими секциями и сериями стрептомицетов являлись *Albus Albus*, *Imperfectus*, *Helvolo-Flavus Helvolus* и *Roseus Lavandueae-Roseus*.

На территории природного заповедника Суалиен исследованы образцы бурой лесной почвы и растительного опада горного тропического леса на гребне хребта на высоте 1260 м над уровнем моря. Показатели численности актиномицетов в опаде и в почве сравнимы между собой и составляли  $1.7 \times 10^5$  и  $0.3 \times 10^5$  КОЕ/г соответственно. Также на данном участке исследованы образцы подвешенных почв из корзинок эпифитного папоротника *Drynaria* sp. Численность актиномицетов по результатам посева сходна с результатами в сопряженных субстратах и составляла  $1.2 \times 10^5$  КОЕ/г, при этом таксономическое разнообразие стрептомицетов значительно выше, выделялись представители секции и серий *Cinereus Achromogenes*, *Albus Albus*, *Cinereus Chromogenes*, *Roseus Lavandueae-Roseus*, *Inperfertus*, *Cinereus Violacius*.

На территории охраняемого леса Тэйзянг исследованы субстраты, отобранные на двух высокогорных участках. В растительном опаде леса на хребте (1450 м над уровнем моря) численность актиномицетов составляла  $0.8 \times 10^4$  КОЕ/г, в почве, формирующейся под ним –  $4.1 \times 10^4$  КОЕ/г. В гидроморфных условиях обилие актиномицетов было выше. Наблюдался схожий характер распределения, как и в ранее описанных участках, для которых характерны условия повышенной влажности: численность актиномицетов в опаде отмечалась выше, чем в образцах почвы ( $1.1 \times 10^6$  и  $4.0 \times 10^5$  КОЕ/г соответственно). На данной территории проанализированы образцы подвешенной почвы из корзинок эпифитного папоротника *Drynaria* sp. Содержание культивируемых актинобактерий составляло  $3.1 \times 10^5$  КОЕ/г, что схоже с показателями, отмеченными для подвешенных почв ранее описанных природных заповедников.

В ходе работы штаммы чистых культур актиномицетов, выделенные из исследованных субстратов, проверяли на устойчивость к ряду физико-химических воздействий (температура, pH, присутствие солей) и на способность проявлять амилазную и целлюлолитическую активность. Среди 92 штаммов 29% показали способность к росту при температуре 2 °C, 56% – при температуре 4 °C и 10 °C. Максимальная температура роста для большинства штаммов составила 37 °C. Более половины изученных штаммов были способны расти на питательной среде с содержанием 5% хлорида натрия и в диапазоне значений pH 4–11. Для выделенных штаммов актиномицетов проводили оценку способности разложения органических субстратов. Все культуры проявили способность к разложению крахмала, более 60% – к разложению целлюлозы.

Таким образом было установлено, что актинобактерии играют важную роль в прокариотных сообществах тропических почв Вьетнама. Их высокая численность, разнообразие таксонов и уникальные экофизиологические свойства свидетельствуют о значительном вкладе актиномицетов в биологические циклы тропических лесов. Широкий диапазон устойчивости и активности штаммов подчеркивают их потенциал для использования в различных экологических и биотехнологических прикладных целях.

# ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ШТАММ *LACTOBACILLUS PARACASEI* LPC-37 КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

П.С. Дудик<sup>85, 86</sup>, Д.К. Армянинова<sup>87</sup>

*Lactobacillus paracasei* – вид молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* (LAB), разрешенный для использования в качестве пробиотика, как для человека, так и для животных. Лактобациллы устойчивы к кислой среде желудка, к гидролизу пищеварительными ферментами млекопитающих и успешно прикрепляются к слизистому эпителию кишечника (мукоза), с которым ассоциирована лимфоидная ткань (MALT), которая участвует в формировании иммунитета к кишечным патогенам [1].

Рекомбинантные штаммы рода *Lactobacillus* успешно используются в качестве вакцин, экспрессируя как вирусные, так и бактериальные антигены множества заболеваний сельскохозяйственных животных [2].

Получение новых рекомбинантных штаммов нередко может ограничиваться трудностями или даже невозможностью введения ДНК в клетки. Представители рода *Lactobacillus* демонстрируют гетерогенность и в способности к эффективной трансформации рекомбинантными векторами. Электропорация или электрическая трансформация чаще других встречается в публикациях, однако для успешной работы с лактобактериями протоколы трансформации должны быть оптимизированы не только для каждого вида, но и для каждого штамма [3].

В литературных источниках встречается множество протоколов, отличающиеся друг от друга теми или иными условиями. Для *L. paracasei* LPC-37 нет протокола приготовления компетентных клеток, а также не выявлены условия для проведения эффективной трансформации, поэтому нами было принято решение создать свой комбинированный протокол. Бактериальную культуру выращивали в среде MRS (De Man, Rogosa и Sharpe), содержащую 1% глицин, до значения оптической плотности 0,6. Далее электрокомпетентные клетки подготавливали путем отмывки глицерином 10% или PEG-8000 6%. С целью повышения эффективности трансформации, непосредственно перед электропорацией, лактобациллы обрабатывали водой или ацетатом лития с дитиотреитолом. Вариант без использования предварительной обработки перед электропорацией также присутствовал. Все этапы электропорации

<sup>85</sup> Институт Биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>86</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>87</sup> Институт Биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

проводили на холоду. На конечном этапе трансформированные клетки инкубировали 3 часа в среде MRS с 0,5% сахарозой.

Наши предварительные результаты по оценке показателей эффективности трансформации представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Показатели эффективности трансформации *L. paracasei* Lpc-37 (КОЕ/мкг) при отмывке PEG-8000 6% и различными способами обработки клеток

Способ обработки клеток	Отмывка PEG-8000 6%					
	Параметры электропоратора Ω и kV					
	200, 1.5	200, 2.0	200, 2.5	400, 1.5	400, 2.0	400, 2.5
LiAc\DTT	7.7*10 <sup>4</sup>	2.6*10 <sup>5</sup>	1.4*10 <sup>5</sup>	3.6*10 <sup>4</sup>	1.6*10 <sup>5</sup>	1.9*10 <sup>5</sup>
Вода	1.5*10 <sup>4</sup>	4.6*10 <sup>3</sup>	1.7*10 <sup>5</sup>	3.3*10 <sup>4</sup>	2.2*10 <sup>4</sup>	3.7*10 <sup>4</sup>
Без обработки	1.3*10 <sup>3</sup>	1.9*10 <sup>4</sup>	0	1.3*10 <sup>3</sup>	5.3*10 <sup>3</sup>	1.3*10 <sup>3</sup>

Таблица 2.

Показатели эффективности трансформации *L. paracasei* Lpc-37 (КОЕ/мкг) при отмывке глицерином 10% и различными способами обработки клеток

Способ обработки клеток	Отмывка глицерином 10%					
	Параметры электропоратора Ω и kV					
	200, 1.5	200, 2.0	200, 2.5	400, 1.5	400, 2.0	400, 2.5
LiAc\DTT	2.5*10 <sup>4</sup>	1.2*10 <sup>4</sup>	4.6*10 <sup>3</sup>	2*10 <sup>4</sup>	1.1*10 <sup>4</sup>	1.3*10 <sup>4</sup>
Вода	1.5*10 <sup>5</sup>	2.2*10 <sup>4</sup>	2.2*10 <sup>4</sup>	1.9*10 <sup>4</sup>	5.1*10 <sup>4</sup>	4.6*10 <sup>4</sup>
Без обработки	1.5*10 <sup>4</sup>	1.1*10 <sup>4</sup>	1.1*10 <sup>4</sup>	6*10 <sup>3</sup>	6.6*10 <sup>3</sup>	5.9*10 <sup>3</sup>

На данный момент, как видно из таблиц, оптимальными условиями для трансформации *L. paracasei* Lpc-37 являются обработка клеток ацетатом лития с дитиотреитолом и параметры 200 Ω и 2.0 kV для электропорации.

**Список литературы:**

1. Börner, R.A., Kandasamy, V., Axelsen, A.M., et al., Genome Editing of Lactic Acid Bacteria: Opportunities for Food, Feed, Pharma and Biotech, FEMS Microbiology Letters, 2019 vol. 366, no. 1, pp. 1–12, <https://doi.org/10.1093/femsle/fny291>
2. LeCureux, J.S., Dean, G.A., Lactobacillus Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens, MSphere, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 1–15, <https://doi.org/10.1128/msphere.00061-18>
3. Nickoloff, J.A., Electroporation Protocols for Microorganisms, USA: New Jersey, 1995

Данная работа выполнена при поддержке внутреннего гранта  
Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН на поддержку научных исследований, выполняемых молодыми учеными от 5 апреля 2024 года

# *AZOTOBACTER VINELANDII* 12 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОДУЦЕНТ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АЛЬГИНАТА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИЙ

А.А. Дудун<sup>88, 89</sup>, А.П. Бонарцев<sup>90</sup>, Г.А. Бонарцева<sup>91</sup>

Использование бактериальных альгинатов привлекает все большее внимание исследователей, работающих в области биомедицины и биотехнологий [1]. Альгинаты являются биополимерами с высокой биосовместимостью, которые также характеризуются способности к биодegradации, что обуславливает значительные перспективы их использования в медицине [2]. По своей химической структуре, альгинаты представляют собой неразветленные полисахариды, состоящие из  $\beta$ -D-маннуроновых кислот (M) и  $\alpha$ -L-гулууроновых кислот (G), которые между собой образуют 1–4 гликозидные связи. Гелеобразование альгината происходит за счет способности ионотропного связывания полимера с двувалентными катионами. В настоящее время единственным источником получения альгинатов в промышленности являются морские бурые водоросли, но также известно, что большинство бактерий рода *Azotobacter* sp. способны к синтезу полимера. Процесс бактериального синтеза альгината, в отличие от водорослевого, можно контролировать в лабораторных условиях за счет изменения условий культивирования. Кроме того, бактериальный альгинат обладает ацетильными группами на маннуроновых остатках, данные группы увеличивают отрицательный заряд полисахарида и позволяют создавать более плотные гидрогели, которые можно использовать в широком диапазоне медицинских задач [3].

Ранее, мы оценивали биосинтез альгината в различных штаммах бактерий рода *Azotobacter* sp. и в результате именно штамм *A. vinelandii* 12 демонстрировал максимальный выход альгинатов [4]. На основании этих данных в текущем исследовании был выбран штамм *A. vinelandii* 12 для синтеза низкомолекулярного свободного альгината и высокомолекулярного капсулярного альгината при разных концентрациях сахарозы в ростовой среде. Также был проведен анализ генома *A. vinelandii*

<sup>88</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

<sup>89</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

<sup>90</sup> Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>91</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

12 с целью нахождения генов, ответственных за синтез, регуляцию и деградацию альгината.

**Методы:** Культивирование штамма проводилось в жидкой среде Берка [5] при разных концентрациях сахарозы, а именно 20 и 30 г/л, соответственно. Содержание ростовой среды в качалочных колбах составило 100 мл. Скорость ферментации бактерий в микробиологической качалке было 250 об/мин в течении 72 ч и 96 ч при 28 °С, рН среды – 7.2 [5].

По окончании ферментации все варианты были центрифугированы при 11000 g в течение 30 минут с целью разделения клеточной биомассы и культуральной жидкости для выделения двух разных типов альгината, а именно свободный, который выделяется непосредственно из культуральной среды и капсулярный, который выделяется из клеточной биомассы. Свободный и капсулярные альгинаты выделялись по методикам, описанными в наших работах ранее [6].

Было проведено полногемное секвенирование, сборка, структурный и функциональный анализ генома для поиска генов, участвующих в метаболизме альгината.

**Результаты:** Синтез альгинатов бактерией *A. vinelandii* 12 показал, что с увеличением концентрации сахарозы увеличивался и общий выход полимера, как свободного, так и высокомолекулярного капсулярного альгината (Рисунок 1). Можно предположить, что сахароза как единственный источник углерода в среде и изначально высокий уровень аэрации (100 мл культуральной жидкости) делает данный фактор ключевым в синтезе обоих типов альгината с целью защиты нитрогеназных комплексов от чрезмерного проникновения молекулярного кислорода внутрь бактериальных клеток.

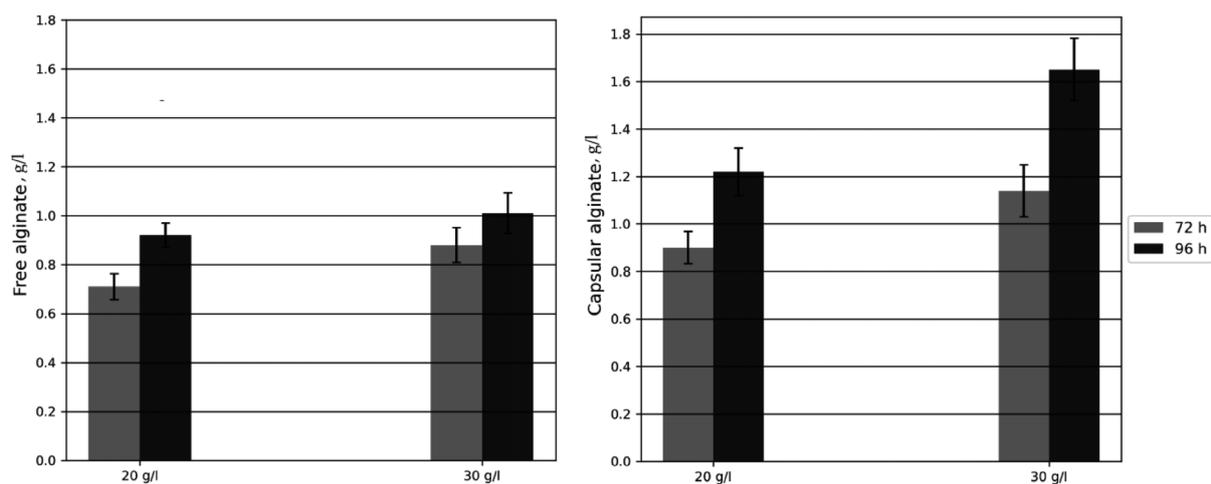


Рис. 1. Синтез свободного и капсулярного альгината бактерией *A. vinelandii* 12

Геномная сборка бактерии *A. vinelandii* 12 включала 198 контига, общая протяженность составила 5283715 п.н., Г+Ц состав превысил 65%. Было найдено 4748 генов, кодирующих белки, 57 гена тРНК и 3 – рРНК (Рисунок 2). Были идентифицированы гены,

ответственные за синтез альгината (*alg8*, *algE*, *algX*, *algI*, *algJ*, *algF*, *algC*), за регуляцию синтеза альгината (*algQ*, *algB*, *algW*, *algU*, *mucB*) и за расщепление альгината (*algL*).

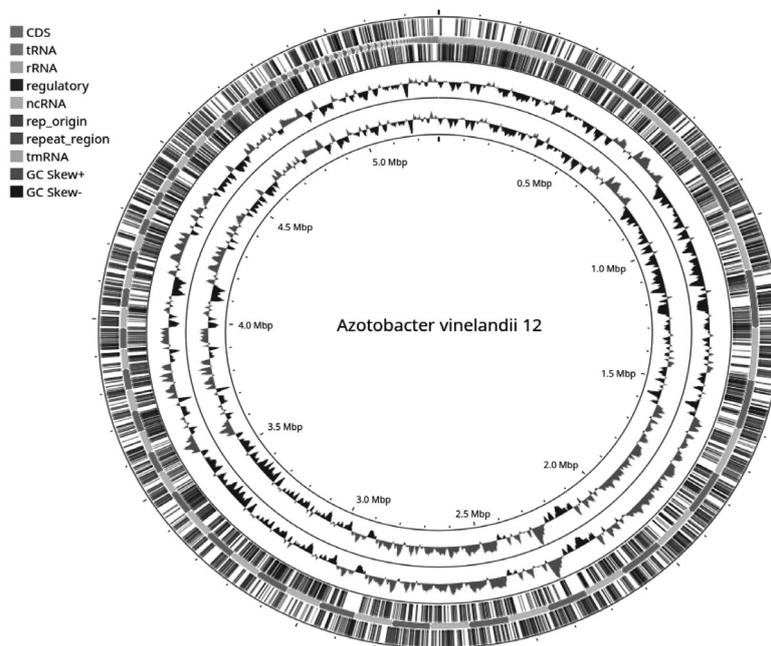


Рис. 2. Геном бактерии *A. vinelandii* 12, более 86% занимают последовательности, кодирующие белки

Таким образом, показано, что бактерия *A. vinelandii* 12 является альгинат-продуцирующим штаммом и преимущественно штаммом, нацеленным на синтез высокомолекулярного капсулярного альгината.

Работа поддержана Российским научным фондом, проект № 23-74-10027.

### Список литературы:

1. Jia J et al.. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomaterialia*. Volume 10, Issue 10, October 2014, Pages 4323-4331.
2. Itoh K. et al. In situ gelling xyloglucan/alginate liquid formulation for oral sustained drug delivery to dysphagic patients. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010;36 (4):449–55.
3. Urtuvia V. et al. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol* (2017) 33:198. *Biotechnol* (2017) 33:198.
4. Bonartseva G. et al. Alginate Biosynthesis by *Azotobacter* Bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2017, 53, 52–59.
5. Dudun A. et al. Biosynthesis of Alginate and Poly(3-Hydroxybutyrate) by the Bacterial Strain *Azotobacter Agile* 12. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2019, 55, 654–659.
6. Dudun A. et al. Competitive Biosynthesis of Bacterial Alginate Using *Azotobacter vinelandii* 12 for Tissue Engineering Applications. *Polymers*, 2022, Vol. 14, No. 1, P. 131.

# ТЕРМОФИЛЬНЫЕ СЕРООКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ КАЛЬДЕРЫ УЗОН

А.М. Дукат<sup>92, 93</sup>, А.Г. Ельченинов<sup>94</sup>, Е.Н. Фролов<sup>95</sup>

Сероокисляющие бактерии – это физиологическая группа микроорганизмов, участвующих в окислительных реакциях геохимического цикла серы. Они ответственны за окисление сульфида, тиосульфата, полиотионатов, полисульфида, элементной серы, сульфита и некоторых органических соединений серы в пограничной области между анаэробной и аэробной зонами. Серобактерии представляют собой физиологически и филогенетически разнородную группу микроорганизмов. С точки зрения физиологии можно выделить фототрофных и хемотрофных сероокисляющих бактерий. К первой группе относятся пурпурные и зелёные серобактерии, а также некоторые цианобактерии, ко второй группе – одноклеточные и нитчатые бесцветные серные и тионовые бактерии. Бесцветные серобактерии в микробных сообществах термальных местообитаний зачастую являются первичными продуцентами, доля которых может достигать 95%. Такие местообитания многочисленны на полуострове Камчатка, который известен своей продолжительной вулканической активностью. Однако, несмотря на длительную историю изучения сероокисляющих бактерий, берущую свое начало с работ С.Н. Виноградского, количество данных о разнообразии и роли бесцветных серобактерий в круговороте веществ в природе является недостаточным. В первую очередь это связано с трудностью выделения и культивирования чистых культур, объясняющуюся необходимостью создания микроаэробных условий, специфичных для экологической ниши бесцветных серобактерий в природе. В ходе данной работы из горячих источников кальдеры Узон были выделены и охарактеризованы два штамма бесцветных сероокисляющих бактерий, АК1 и EF100.

Клетки штамма АК1 имели вид палочек длиной 1,0–2,0 мкм и диаметром 0,3–0,4 мкм. Клетки были подвижны за счет наличия жгутика, расположенного полярно на одном из концов клетки. Ультратонкие срезы клеток показали наличие грамотрицательной клеточной стенки. Спорообразования не наблюдалось. Штамм АК1 рос как в аэробных, так и в микроаэробных условиях при концентрации кислорода в газовой фазе от 1 до 20% с оптимумом при 10%. Новый изолят является умеренным термофилом,

<sup>92</sup> Сколковский институт науки и технологий, Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, 21205, Россия

<sup>93</sup> E-mail: anna.dukat.m@gmail.com

<sup>94</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, Москва, 117312, Россия

<sup>95</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, Москва, 117312, Россия

способным расти в диапазоне температур от 37 до 55 °С с оптимумом при 50 °С и в диапазоне рН от 4,8 до 7,0 с оптимумом при рН 5,2. Штамм АК1 являлся облигатным хемолитоавтотрофом, который использовал сульфид, тиосульфат или элементную серу в качестве доноров электронов, кислород в качестве акцептора электронов и углекислый газ в качестве источника углерода. Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рРНК, показал, что штамм АК1 относится к роду *Thiobacter*. Последовательность гена 16S рРНК штамма АК1 имела сходство 97,9 % с гомологичной последовательностью *T. subterraneus*. На основании полученных результатов нами был предложен новый вид '*Thiobacter aerophilum*' sp. nov.

Анализ генома штамма АК1 позволил выявить гены, кодирующие ферменты, ответственные за окисление серных соединений: сульфид: хиноноксидоредуктаза SQR, сульфид: флавоцитохром с дегидрогеназа FCC, комплекс SoxABXYZ, обратная диссимиляционная сульфитредуктаза dsrABEFHNCMKLJOPNRS, сульфит: цитохром с оксидоредуктаза SoqAB, мембраносвязанная сульфит: хинон оксидоредуктаза SoeABC. Кроме того, вероятно окисление сульфита по непрямому АФС-редуктазному/АТФ-сульфуриазному пути, который может осуществляться или через АФС-редуктазу AprAB и АТФ-сульфуриазу Sat. При окислении восстановленных серных соединений электроны поступают в аэробную ЭТЦ на уровне убихинонов и на уровне цитохрома с. Убихинолы окисляются комплексом цитохромов bc<sub>1</sub>, после чего электроны поступают на цитохром с-типа и далее на терминальную оксидазу. В геноме штамма АК1 были выявлены гены, кодирующие 4 терминальные оксидазы: две цитохром cbb<sub>3</sub> оксидазы, цитохром aa<sub>3</sub> оксидаза и убихинол: цитохром bd оксидаза. Такое разнообразие оксидаз, имеющих разное сродство к кислороду, объясняет способность штамма АК1 расти в широком диапазоне концентраций кислорода. Мы предполагаем, что ассимиляцию углекислоты штамм АК1 осуществляет через цикл Кальвина–Бенсона–Бассама, кроме того, при анализе генома штамма АК1 были выявлены гены, кодирующие неполный набор ферментов цикла трикарбоновых кислот.

Клетки штамма EF100 имели вид палочек длиной до 1,5 мкм и диаметром 0,3–0,4 мкм. Клетки были подвижны за счет наличия жгутика, расположенного полярно на одном из концов клетки. Спорообразование не наблюдалось. Штамм EF100 рос в микроаэробных и аэробных условиях при концентрации кислорода в газовой фазе от 0,5 до 20% с оптимумом при 5%. Новый изолят являлся умеренным термофилом, способным расти в диапазоне температур от 30 до 50 °С с оптимумом при 37 °С и в диапазоне рН от 5,0 до 8,0 с оптимумом при рН 6,0. Штамм EF100 являлся облигатным хемолитоавтотрофом, который использовал сульфид, тиосульфат, тетратионат или элементную серу в качестве доноров электронов, кислород в качестве акцептора электронов и углекислый газ в качестве источника углерода. Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рРНК, показал, что штамм EF100 относится к виду *Thiofaba tepidiphila* семейства *Halothiobacillaceae* порядка *Chromatiales* класса *Gamma*proteobacteria филума *Pseudomonadota*. Последовательность

гена 16S рРНК нового изолята имела сходство 100,0% с гомологичной последовательностью *T. tepidiphila*. Таким образом, штамм EF100 является новым штаммом внутри вида *T. tepidiphila*. Анализ генома *Thiofaba tepidiphila* EF100 позволил выявить гены, ответственные за окисление серных соединений, это сульфид: хиноноксидоредуктаза SQR, сульфид: флавоцитохром с дегидрогеназа FCC, комплекс SoxABCDXYZW, тетраионатгидролаза Tth и тиосульфатдегидрогеназа Tsd. Электроны при окислении восстановленных серных соединений поступают в ЭТЦ на уровне убихинонов и цитохрома с. Аэробная ЭТЦ штамма EF100 включает в себя комплекс цитохромов bc1, цитохром с и терминальную оксидазу. В геноме были найдены гены двух терминальных оксидаз: цитохром cbb3 оксидазы и цитохром B(O/a)3 оксидазы. Также мы предполагаем, что ассимиляцию углекислоты штамм EF100 осуществляет через цикл Кальвина–Бенсона–Бассама, а цикл трикарбоновых кислот у этого микроорганизма незамкнут, поскольку отсутствуют гены 2-оксоглутаратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы.

Таким образом, в ходе данной работы были выделены и охарактеризованы два новых штамма термофильных серобактерий, а подробный анализ их геномов позволил выявить гены, кодирующие ферменты окисления восстановленных серных соединений, компоненты электрон-транспортных цепей и ферменты центрального метаболизма углерода.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 24-14-00177.*

# БИООКИСЛЕНИЕ УПОРНОГО ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩЕГО КОНЦЕНТРАТА В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ

А.М. Дюбарь<sup>96</sup>, А.В. Артыкова<sup>97</sup>, Ю.А. Елкина<sup>98</sup>, А.В. Колосов<sup>99</sup>,  
В.С. Меламуд<sup>100</sup>, А.В. Нечаева<sup>101</sup>, А.В. Марданов<sup>102</sup>, А.Г. Булаев<sup>103</sup>

Реакторное биоокисление используют для повышения извлечения золота из упорных пирит-арсенопиритных сульфидных концентратов [1–3]. Основой биогидрометаллургической переработки сульфидных концентратов является биоокисление сульфидных минералов, которое осуществляет аэробные ацидофильными железо- и сероокисляющие микроорганизмы. Промышленные процессы биоокисления сульфидных концентратов осуществляются при температурах 40–45 °С из-за выделения тепла при окислении минералов, поэтому в микробных сообществах реакторов биоокисления преобладают различные термотолерантные и умеренно-термофильные ацидофильные микроорганизмы [3]. Было показано, что использование дополнительных источников углерода (органических субстратов или диоксида углерода) позволяет интенсифицировать процессы биоокисления сульфидных концентратов, влияет на состав микробных сообществ и позволяет снижать ингибирующий эффект негативных факторов (повышение температуры пульпы реакторов) [2].

Задачей данной работы было исследование возможности нивелирования негативного воздействия на процесс биоокисления пирит-арсенопиритного концентрата повышения плотности пульпы и температуры с помощью использования диоксида углерода.

---

<sup>96</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>97</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>98</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>99</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>100</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>101</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>102</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>103</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

В работе использовали сульфидный концентрат, который содержал пирит (48%) и арсенопирит (13%), сульфидное железо ( $Fe_s$ ) – 26.9%, сульфидный мышьяк ( $As_s$ ) – 6.0%, сульфидную серу ( $S_s$ ) – 25.0%, а также 43.0 г/т золота. Использовали технологические параметры (температура, плотность пульпы, время пребывания) близкие к параметрам промышленных процессов (40 °С, плотность пульпы (Т : Ж) составляла 1 : 10, 5 сут), а также «стрессовые условия», когда температуру и плотность пульпы резко повышали, создавая неблагоприятные условия для биоокисления (50 °С, плотность пульпы (Т : Ж) составляла 1 : 5, 5 сут). Для определения влияния диоксида углерода на процесс биоокисления в пульпу реакторов осуществляли подачу  $CO_2$  (примерно 0.01 л/мин). Эксперименты проводили параллельно в двух контрольных реакторах, в которые не подавали углекислоту, и в двух реакторах, в которые подавали углекислоту. В качестве инокулята использовали смешанную пульпу биореакторов, полученную при биоокислении пирит-арсенопиритного концентрата [3]. Для анализа активности процесса биовыщелачивания отбирали пробы жидкой фазы пульпы реакторов, в которых определяли параметры, характеризующие интенсивность биоокисления: рН, окислительно-восстановительный потенциал (Еh), содержание двух- и трехвалентного железа, мышьяка и общую численность клеток микроорганизмов. Состав микробных сообществ определяли с высокопроизводительного секвенирования V3-V4 переменных фрагментов генов 16S рРНК [3]. Содержание элементов в пробах твердой фазы проводили на рентгенофлуоресцентном спектрометре Thermo ARL Perform'x Sequential XFRF (Thermo Fisher Scientific, США)

Результаты экспериментов отражены в Таблицах 1–4. В «нормальных условиях» влияние дополнительного  $CO_2$  на биоокисление сульфидного концентрата было незначительным, что демонстрировалось как параметрами жидкой фазы пульпы (Таблица 1), так и анализом твердых продуктов биоокисления (Таблица 3).

Таблица 1.

Усредненные значения параметров жидкой фазы пульпы реакторов биоокисления в «нормальных условиях»

Реактор	Т:Ж	Т, °С	$CO_2$	рН	Еh, мВ	$Fe^{3+}$ , г/л	$Fe^{2+}$ , г/л	$N \times 10^7$ , кл/мл
1	1 : 10	40	+	0,98±0,06	776±13	26,98±1,95	0,09±0,12	198±65
2	1 : 10	40	-	0,98±0,03	783±18	26,28±1,85	0,14±0,30	157±47
3	1 : 10	40	+	0,94±0,07	785±9	27,00±1,61	0,04±0,10	181±72
4	1 : 10	40	-	0,92±0,06	775±14	23,67±2,11	0,16±0,20	124±25

При этом в «стрессовых условиях», активность биоокисления сульфидных минералов в значительной степени снизилась, по сравнению с «нормальными» (Таблицы 2 и 3), однако добавление диоксида углерода позволило частично нивелировать негативные эффекты изменения условий процесса.

Таблица 2.

Усредненные значения параметров жидкой фазы пульпы реакторов  
биоокисления в «стрессовых условиях»

Реактор	Т:Ж	Т, °С	CO <sub>2</sub>	рН	Еh, мВ	Fe <sup>3+</sup> , г/л	Fe <sup>2+</sup> , г/л	N×10 <sup>7</sup> , кл/мл
1	1 : 5	40	+	0,86±0,06	733±10	25,20±1,97	0,95±0,46	223±40
2	1 : 5	40	-	1,09±0,09	668±13	15,18±2,86	4,09±0,96	150±49
3	1 : 10	50	+	1,09±0,07	684±17	10,36±1,94	1,51±1,35	12±8
4	1 : 10	50	-	1,30±0,06	663±3	2,58±0,62	2,58±0,62	7±4

Таблица 3.

Степень окисления сульфидных минералов концентрата, %

Режим	Реактор	Арсенопирит (FeAsS)	Пирит (FeS <sub>2</sub> )
«Нормальные условия»	1	97,4	81,0
	2	97,1	75,6
	3	97,1	81,1
	4	97,2	74,3
«Стрессовые условия»	1	89,8	45,7
	2	69,9	23,5
	3	64,0	28,8
	4	58,6	26,5

Таблица 4.

Результаты анализа микробных популяций биореакторов  
(% последовательностей фрагментов генов 16S рРНК  
основных групп микроорганизмов)

Группа микроорганизмов	инокулят	«Нормальные условия»				«Стрессовые условиях»			
		реактор				реактор			
		1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Acidithiobacillus</i>	13,1	10,9	13,9	14,4	37,1	46,3	17,3	4,0	38,0
<i>Sulfobacillus</i>	85,6	3,4	1,1	1,7	1,6	0,5	0,0	91,1	47,5
<i>Leptospirillum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	2,1
<i>Ferroplasma</i>	1,3	85,6	84,9	83,8	60,6	53,1	82,4	1,4	6,5
A-plasma	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	2,8	0,1
Ацидофильные микроорганизмы (всего)	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	99,8	94,3
Прочие микроорганизмы	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	5,7

Анализ микробных популяций биореакторов (таблицы 1, 2 и 4) показал, что добавление диоксида углерода в «стрессовых условиях» привело как к увеличению общей

численности клеток микроорганизмов по сравнению с контрольными реакторами, так и изменению количественных соотношений между разными группами микроорганизмов. Таким образом, показано, что использование дополнительного диоксида углерода в «стрессовых условиях» оказывало влияние на микробные популяции биореакторов, что, в свою очередь, влияло и на скорость окисления сульфидных минералов.

Результаты, полученные в данной работе, а также их сопоставление с результатами наших предыдущих работ [2] позволяют заключить, что использование дополнительных источников углерода, в частности диоксида углерода, позволяет контролировать активность микроорганизмов в процессах биоокисления сульфидных концентратов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН.

### **Список литературы:**

1. Mahmoud A., Cezac P., Hoadley A.F.A., Contaminea F., D'Hugues P. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2017. – V. 119. – P. 118–146.
2. Bulaev A., Boduen A. Carbon sources as a factor determining the activity of microbial oxidation of sulfide concentrate at elevated temperature // *Minerals*. – 2022. – V. 12. – 110.
3. Johnson, D.B. Biomining-Biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 30, 24–31.

# ФАКТОРЫ ГУМОРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА КАК МОЛЕКУЛЫ-МОДИФИКАТОРЫ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОТНОШЕНИИ МОНОВИДОВЫХ И БИНАРНЫХ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *KYTOCOCCUS SCHROETERI*

Е.В. Дювенжи<sup>104</sup>, Е.Д. Неволина<sup>105</sup>, С.В. Мартьянов<sup>106</sup>, М.В. Журина<sup>107</sup>,  
А.В. Козлов<sup>108</sup>, В.К. Плакунов<sup>109</sup>, А.В. Ганнесен<sup>110</sup>

Одной из наиболее актуальных и широко изучаемых проблем микробиологии и медицины является повышенная устойчивость биопленок патогенных бактерий к антибиотикам. Эффективным методом воздействия на патогенные микроорганизмы является комбинированная терапия – совместное применение антибиотика в сочетании с другими соединениями. Целью работы было исследовать модулирующее действие факторов гуморальной регуляции – натрийуретического пептида типа А и норадреналина на активность антибиотика азитромицина.

В исследованиях применяли количественные и качественные методы анализа микробных сообществ, а именно подсчет КОЕ, оценку биомассы клеток (окрашивание биопленок различными красителями), оценку жизнеспособности клеток, а также различные современные методы, включая конфокальную микроскопию и количественную ПЦР.

Полученные результаты показали, что натрийуретический пептид типа А и норадреналин способны модулировать эффект азитромицина в отношении моновидовых и двухвидовых биопленок исследованных микроорганизмов. Модулирующий эффект гормонов зависел от модельной системы, времени инкубации и от состава биопленки (моновидовая или бинарная). Было показано, что гормоны способны снимать ингибирующее действие азитромицина в высокой концентрации, что выразалось в соот-

<sup>104</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>105</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>106</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>107</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>108</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>109</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>110</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

ветствующих изменениях кинетических параметров роста и плотности биомассы. Эти данные могут объяснить малорезультативность антибиотикотерапии, даже с учетом того, что микроорганизмы не обладают устойчивостью к данному классу антибиотика. Также, было показано, что азитромицин в сочетании с гормонами увеличивает экспрессию генов устойчивости и к другим классам антибиотиков, при этом активные соединения по отдельности ее снижают. Например, в моновидовой биопленке *S. aureus* в присутствии азитромицина в концентрации 4 мкг/мл и натрийуретического пептида увеличивалась экспрессия гена MgrA, ответственного за устойчивость к пептидным антибиотикам, тетрациклинам и цефалоспорином.

В заключении хотелось бы отметить, что полученные данные свидетельствуют о способности гормональных соединений изменять действие уже существующих антибиотиков, что открывает большие перспективы как для фундаментальной науки, так и для прикладных областей знания.

# МИКОБИОТА КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ПЛОДОВ ТОМАТА, ВЫРАЩЕННЫХ В МАЛИ

А.С. Еланский<sup>111</sup>, Д. Симбо<sup>112</sup>, С.Н. Еланский<sup>113, 114</sup>,  
Е.Н. Пакина<sup>115</sup>, Е.М. Чудинова<sup>116</sup>

Картофель и томат – пластичные культуры, способные давать урожай в большинстве стран мира. К сожалению, эти культуры пользуются популярностью не только у людей, но и у многочисленных паразитических организмов. В данной работе проанализированы штаммы микроорганизмов, выделенные из выращенных в Мали клубней картофеля и плодов томата с симптомами грибных болезней. Поврежденные клубни были отобраны из убранного картофеля в 3 фермерских хозяйствах в областях Куликоро и Сегу, томаты – в Куликоро. Всего были выделены 26 штаммов с картофеля и 4 штамма с томата.

Видовая принадлежность выделенных в чистые культуры штаммов определялась на основании культурально-морфологических признаков и с помощью секвенирование видоспецифичных участков рибосомных генов (ITS1-5,8S-ITS2) и участка гена фактора элонгации трансляции 1 $\alpha$  (*tef1 $\alpha$* ). Штаммы, выделенные с картофеля, относились к видам *Clonostachys rosea* (1 штамм), *Fusarium* sp. (20 штаммов), *Galactomyces candidum* (= *Geotrichum candidum*) (5 штаммов). Из 20 штаммов рода *Fusarium* 11 относились к видовому комплексу *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC). Также были выявлены штаммы из комплексов *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC, 4 штамма), *Fusarium solani* species complex (FSSC, 2 штамма), *Fusarium sambucinum* species complex (FSamSC, 2 штамма), *Fusarium tricinctum* species complex (FTrSC, 1 штамм). Из плодов томата были выделены по 1 штамму *Colletotrichum truncatum* и *Alternaria solani* и 2 штамма рода *Fusarium* из комплекса FIESC.

Штаммы из комплексов FOSC, FSSC, FSamSC часто встречаются на картофеле. В наших исследованиях группы FOSC и FSSC чаще других встречались на клубнях картофеля в Уганде (Elansky et al., 2024) и в России (неопубликованные данные). FSamSC преобладали на клубнях в Алжире и Китае (Azil et al., 2021; Du et al., 2012). Отдельно следует сказать о штаммах из группы FIESC. В Мали штаммы этой группы

<sup>111</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>112</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>113</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>114</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>115</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>116</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

были выделены как с картофеля, так и с томата, причем по последовательностям генов ITS1-5,8S-ITS2 и *tefla* томатные и картофельные штаммы отличались друг от друга. В то же время среди более 110 протестированных изолятов, выделенных из клубней картофеля с симптомами сухой гнили, выращенных в разных регионах России, не выявлено ни одного штамма из этой группы. Однако они были обнаружены на листьях и стеблях картофеля, выращенного в Архангельской, Астраханской, Московской областях. В более южных странах штаммы FIESC не так уж редки на клубнях картофеля. Нами они были выделены из клубней с симптомами сухой гнили, выращенных в Уганде (Elansky et al., 2024), Гамбии, Узбекистане (неопубликованные данные). Другие исследователи отмечали их присутствие в Алжире, Китае и в США (Azil et al., 2021; Du et al., 2012, Gachango et al., 2012).

Штаммы вида *Galactomyces candidum* часто встречаются на клубнях картофеля практически во всех картофелеводческих регионах мира. Штамм, найденный на картофеле в Мали, по последовательности ITS отличался от картофельных штаммов, выделенных в России, Китае и Америке (данные из GenBank NCBI).

На плоде томата из Мали был обнаружен *Colletotrichum truncatum*. Этот вид на территории России не был обнаружен, однако документально зарегистрирован в Китае, Малайзии, Мексике, Турции (данные из GenBank NCBI).

*Clonostachys rosea* обычно считают непатогенным для картофеля. Штаммы рода *Clonostachys* даже используют в составе биопрепаратов для защиты картофеля. Однако нами были выявлены патогенные для картофеля штаммы *C. rosea* среди штаммов, выделенных из клубней картофеля, выращенных на Камчатке (Скоков и др., 2024, в печати). Штамм из Мали показал слабую патогенность к тканям клубня картофеля.

Все проверенные штаммы оказались патогенными как для томата, так и для картофеля. Штаммы из комплексов FOOSC, FSSC, FSamSC лучше заражали ломтики клубней картофеля, а штаммы FIESC и *Colletotrichum truncatum* лучше заражали ломтики плодов томата. При этом штаммы *Clonostachys rosea*, *Alternaria solani*, *Galactomyces candidum* заражали и картофель, и томат очень слабо.

В целом виды, выявленные на клубнях картофеля, выращенных в Мали, часто встречаются на клубнях и в других картофелеводческих регионах мира. Однако штаммы грибов одного вида или видового комплекса могут различаться по патогенности, устойчивости к фунгицидам и другим параметрам. Малийские штаммы требуют дальнейшего исследования.

### Список литературы:

1. Скоков и др. Микобиота клубней картофеля, выращенных в Камчатском Крае // Микология и фитопатология. – 2024. – В печати.
2. Azil N. et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tuber dry rot and wilt of potato in Algeria // European Journal of Plant Pathology. – 2021. – Т. 159. – №. 3. – С. 495–509.
3. Du M. et al. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen // Potato Research. – 2012. – V. 55. – P. 175–184.

4. Elansky A. S. et al. Fusarium species affecting potato tubers and tomato fruits in Uganda // Mycology and Phytopathology. – 2024. – Т. 58. – №. 2. – С. 161–172.
5. Gachango E. et al. Fusarium spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides // Plant Disease. – 2012. – V. 96. – P. 1767–1774.

*Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда  
(грант № 23-16-00048).*

# БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ГЕННЫЕ КЛАСТЕРЫ БИОСИНТЕЗА СИДЕРОФОРОВ ЭНДОЛИТНОГО ШТАММА *BACILLUS VELEZENSIS* S18

А.А. Елистратова<sup>117</sup>, Т.М. Ивойлова<sup>118</sup>, Т.В. Ширшикова<sup>119</sup>,  
М.И. Маркелова<sup>120</sup>, М.Р. Шарипова<sup>121</sup>, И.В. Хиляс<sup>122</sup>

В метаболизме бактерий железо является важным элементом, при недостатке которого рост и репродукция бактериальных клеток замедляются. В ходе эволюции микроорганизмы адаптировались к условиям дефицита железа путем продукции специфических нерибосомальных пептидов-сидерофоров [Khan *et al*, 2021; Gaonkar *et al*, 2013]. Сидерофоры являются хелаторами, которые высвобождаясь из клетки во внешнюю среду, связывают трудноусвояемое трехвалентное железо и образуют биодоступный комплекс для бактерий [Leventhal *et al*, 2019]. На ряду с железом, микробные сидерофоры способны связывать и другие необходимые для жизнедеятельности бактерий металлы, например, никель, молибден, марганец и кобальт. Кроме того, известно, что различные металлы способны стимулировать или ингибировать продукцию сидерофоров [Ahmed *et al*, 2014; Gaonkar *et al*, 2013]. Благодаря своей металл-связывающей активности микробные сидерофоры и их продуценты представляют собой основу для создания перспективных технологий биоремедиации загрязненных металлами почв и водных ресурсов, а также в биометаллургии для экстракции металлов из руды путем биовыщелачивания [Gaonkar *et al*, 2013; Sarkodie *et al*, 2022; Osman *et al*, 2019].

В работе проводили анализ генных кластеров биосинтеза сидерофоров (база данных antiSMASH), поиск транспортных белков (база данных TransportDB) и их идентификацию (база данных VacMet) в геноме эндолитного штамма *B. velezensis* S18 (GenBank № JBFMXS000000000.1).

В геноме штамма *B. velezensis* S18 были найдены 19 биосинтетических генных кластеров (БГК), из которых один имеет 100% схожесть с кластером, ответственным за синтез сидерофора бациллибактина штаммом *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168. Кластер 2.3 бациллибактина *B. velezensis* S18 состоит из четырех главных, десяти дополнительных, одного транспортного и других генов. BLAST анализ аминокислотной по-

<sup>117</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>118</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>119</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>120</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>121</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>122</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

следовательности транспортного гена в базе данных NCBI показал 100% идентичность с АТФ-связывающим АВС-транспортером, в базе данных VasMet определил транспортный ген как *modC* ген, кодирующий белок, который вовлечен в импорт вольфрама и молибдена.

Дополнительно был проведен анализ последовательностей всех транспортных генов биосинтетических генных кластеров *B. velezensis* S18, в результате которого удалось установить, что только в кластере 1.3 транспортный ген, относящийся к АВС-транспортерам, идентифицирован в базе данных VasMet как *znuC* (или *yebM*) ген, кодирующий белок, участвующий в импорте цинка. В состав кластера 1.3 входят семь главных биосинтетических генов, одиннадцать дополнительных, один транспортный ген, один регуляторный и другие гены. Биосинтез метаболита кластера 1.3 осуществляется поликетидной синтазой (ПКС) с отсутствующим ацилтрансферазным (АТ) доменом в модулях трансАТ-ПКС. Кластер 1.3 имеет 100% схожесть с БГК *Bacillus velezensis* FZB42 – продуцента макролактоина Н.

В геноме *B. velezensis* S18 обнаружено 280 генов, кодирующих метал-транспортирующие белки, из которых 175 АТФ-зависимые каналы, из них АТФ-связывающие транспортные белки семейства АВС составляют мажорную часть (171); 3 ионных канала, два из которых относятся к семейству транспортеров ионов металлов (МИТ) CorA/Mrs2; 104 вторичных транспортера и 1 неклассифицируемый.

Таким образом, в геноме штамма *B. velezensis* S18 были найдены 19 биосинтетических генных кластеров, из которых один ответственен за биосинтез сидерофора бациллибактина, и дополнительно был предсказан кластер, вовлеченный в биосинтез макролактоина Н, который может обладать металл-связывающей активностью. Ранее нами было показано, что штамм *B. velezensis* S18 обладает множественной устойчивостью к тяжелым металлам и способен в их присутствии секретировать сидерофоры [Elistratova *et al*, 2024]. Проведенные исследования показывают потенциал эндолитного штамма *B. velezensis* S18 в качестве сидерофор-продуцирующего микроорганизма, способного найти применение в экологической и металлургической сферах.

### Список литературы:

1. Ahmed E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S.J.M. Holmström // Microb Biotechnol. – 2014. – V. 7(3). – P. 196–208. – doi: 10.1111/1751-7915.12117.
2. Gaballa A., Helmann J.D. Bacillus subtilis CPx-type ATPases: characterization of Cd, Zn, Co and Cu efflux systems // Biometals. – 2003. – V. 16(4). – P. 497–505. – doi: 10.1023/a:1023425321617.
3. Gaonkar T. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils / T. Gaonkar, S. Bhosle // Chemosphere. – 2013. – V. 93(9). – P. 1835–1843. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.036.
4. Elistratova A.A. Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of Bacillus velezensis S18 / A.A. Elistratova, T.V. Shirshikova, T.M. Ivoilova, M.R. Sharipova, I.V. Khilyas // Limnology and Freshwater Biology. – 2024. – V. 4. – P. 877–880. – DOI:10.31951/2658-3518-2024-A-4-877.

5. Khan A. Antifungal Activity of Siderophore Isolated From Escherichia coli Against Aspergillus nidulans via Iron-Mediated Oxidative Stress / A. Khan, P. Singh, R. Kumar, S. Das, R.K. Singh, U. Mina, G.K. Agrawal, R. Rakwal, A. Sarkar, A. Srivastava // Front Microbiol. – 2021. – V. 12. – doi: 10.3389/fmicb.2021.729032.
6. Khilyas I.V. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentinite rock of the Khalilovsky massif // I.V. Khilyas, A.V. Sorokina, A.A. Elistratova, M.I. Markelova, M.N. Siniagina, M.R. Sharipova, T.A. Shcherbakova, M.E. D'Errico, M.F. Cohen // PLoS One. – 2019. – V. 14(12). – DOI: 10.1371/journal.pone.0225929.
7. Leventhal G.E. Why microbes secrete molecules to modify their environment: the case of iron-chelating siderophores // G.E. Leventhal, M. Ackermann, K.T. Schiessl // J R Soc Interface. – 2019. м V. 16(150). – doi: 10.1098/rsif.2018.0674.
8. Osman Y. Characterization of Aspergillus niger siderophore that mediates bioleaching of rare earth elements from phosphorites / Y. Osman, A. Gebreil, A.M. Mowafy, T.I. Anan, S.M Hamed // World J Microbiol Biotechnol. – 2019. – V. 35(6). – doi:10.1007/s11274-019-2666-1.
9. Sarkodie E.K. A review on the bioleaching of toxic metal(loid)s from contaminated soil: Insight into the mechanism of action and the role of influencing factors / E.K. Sarkodie, L. Jiang, K. Li, J. Yang, Z. Guo, J. Shi, Y. Deng, H. Liu, H. Jiang, Y. Liang, H. Yin, X. Liu // Front Microbiol. – 2022. – V. 13.-- doi: 10.3389/fmicb.2022.1049277.
10. Kehres D.G. The CorA magnesium transporter gene family / D.G. Kehres, C.H. Lawyer, M.E. Maguire // Microb Comp Genomics. – 1998. – V. 3(3). – P. 151–169. – doi: 10.1089/omi.1.1998.3.151.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда  
№ 24-74-00093, <https://rscf.ru/project/24-74-00093/>*

# ДИНАМИКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ У БАКТЕРИЙ *VACILLUS MEGATERIUM* ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

К.В. Ермакова<sup>123</sup>, В.Ю. Ушаков<sup>124, 125</sup>,  
Г.В. Смирнова<sup>126</sup>, О.Н. Октябрьский<sup>127</sup>

Грамположительные бактерии рода *Bacillus* используют в качестве основного низко-молекулярного тиола бацилитиол (BSH) [1], который является функциональным аналогом глутатиона (GSH), широко распространенного как у грамотрицательных прокариот, так и у эукариот. В состав глутатиона и бацилитиола входит серусодержащая аминокислота цистеин, определяющая высокую редокс-активность этих тиолов. Известно, что повышенные концентрации внутриклеточного цистеина являются токсичными, поскольку могут потенцировать реакцию Фентона через восстановление  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  [2]. Образующий гидроксильный радикал может повреждать все важнейшие биомолекулы (ДНК, белки и мембраны). Вследствие этого бактерии строго контролируют уровень свободного внутриклеточного цистеина. Показано, что у грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* экспорт низкомолекулярных тиолов (цистеина и глутатиона) и образование сульфида (продукта десульфуризации цистеина) могут быть включены в поддержание гомеостаза цистеина при таких стрессах как голодание и действие антибиотиков [3].

**Цель данной работы:** исследовать продукцию экстраклеточных низкомолекулярных тиолов (НМТ) и  $H_2S$  при действии антибиотиков на грамположительные бактерии *Bacillus megaterium*.

Бактерии *B. megaterium* VKM 512 культивировали в орбитальном шейкере при 37 °С и 110 об/мин в среде M9 + глюкоза (1%). Детекцию газообразной формы сульфида водорода ( $H_2S$ ) проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой с помощью бумажных полосок, пропитанных ацетатом свинца [4]. Экстраклеточные общие тиолы определяли с ДТНБ по методу *Lawley* [5].

<sup>123</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>124</sup> Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>125</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>126</sup> Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>127</sup> Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь, Россия

Внесение хлорамфеникола (ХАМ) (30 мкг/мл) и ципрофлоксацина (ЦФ) (30 мкг/мл) к растущим бактериям *B. megaterium* приводило к снижению удельной скорости роста по отношению к контролю на 30 и 40 % (не показано).

На рис. 1 показана продукция сероводорода при обработке *B. megaterium* исследуемыми антибиотиками в динамике (А) и суммарное выделение  $H_2S$  за 60 минут роста в присутствии антибиотика (Б). Максимальная продукция  $H_2S$  наблюдалась через 15 мин после добавления обоих антибиотиков. Более значительное количество  $H_2S$  выделялось при обработке бактерий хлорамфениколом.

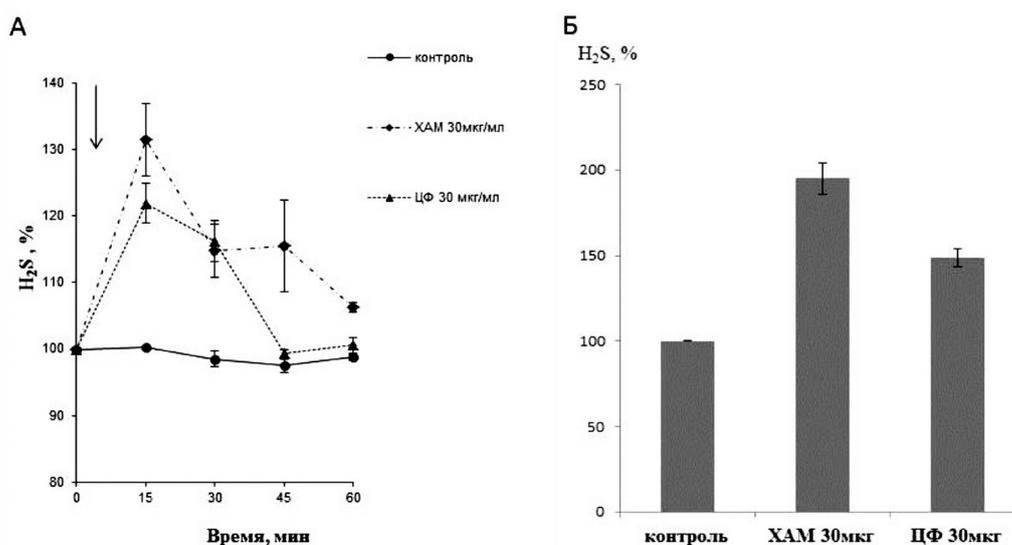


Рис. 1. Продукция сероводорода в растущих культурах *B. megaterium* при добавлении хлорамфеникола (ХАМ) и ципрофлоксацина (ЦФ). Стрелкой указан момент добавления антибиотика

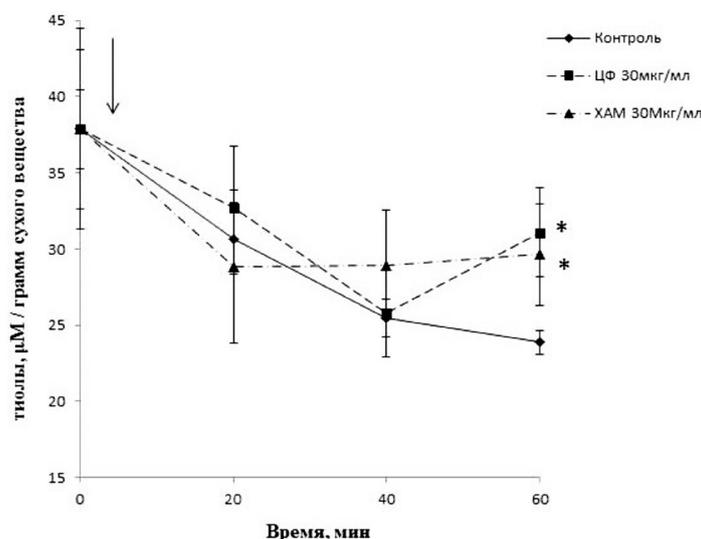


Рис. 2. Динамика экстраклеточных низкомолекулярных тиолов в растущих культурах *B. megaterium* при добавлении хлорамфеникола (ХАМ) и ципрофлоксацина (ЦФ). Стрелкой указано добавление антибиотика

Обработка *B. megaterium* антибиотиками сопровождалась также увеличением концентрации экстраклеточных низкомолекулярных тиолов (рис 2.). Полученные данные позволяют предположить, что увеличение экстраклеточных НМТ и H<sub>2</sub>S является универсальной реакцией бактерий на обработку антибиотиками.

#### Список литературы:

1. Newton G.L., Rawat M., Clair J., Jothivasan V., Budiarto T., Hamilton C., Claiborne A., Helmann J., Fahey R. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli* // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5(9). – P. 625–627.
2. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. // J. Bacteriol. – 2003. – V.185 – P. 1942–1950.
3. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // Amino Acids. – 2019. – V. 51(10-12). – P. 1577–1592.
4. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria // Science. – 2011. – V. 334. – P. 986-990.
5. Lowley P., Thatcher C. Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // Biochem J. – 1970. – V.116. – P. 693–707/

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00093*

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ У ГРИБОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ

А.А. Ермолук<sup>128</sup>, Ф.С. Коблов<sup>129, 130</sup>, Д.А. Авданина<sup>131</sup>, С.Г. Калинин<sup>132</sup>,  
Б.Ф. Васильева<sup>133</sup>, М.В. Демьянкова<sup>134</sup>, О.В. Ефременова<sup>135</sup>, А.А. Жгун<sup>136</sup>

Открытие антибиотиков стало революционным открытием, однако повсеместное использование антибиотиков привело к образованию резистентности у микроорганизмов, опасных для человека [1,2]. Наряду с этим в последние десятилетия количество внедряемых в медицинскую практику антибиотиков сократилось, что ведет к значительным рискам в будущем. Мицелиальные грибы являются одними из основных продуцентов антибиотиков, но большинство из них пока не охарактеризовано с точки зрения их биотехнологического потенциала. Грибы-деструкторы темперной живописи приспособились выживать в экстремальных для большинства других микроорганизмов условиях музейного хранения [3,4]. Возможно, в условиях коллективного церковного пользования некоторые соединения, продуцируемые плесенью, были способны оказывать антисептические воздействия. Тем самым грибы-деструкторы, отобранные ранее в Государственной Третьяковской галерее с древних икон, могут оказаться ценными источниками новых высокоактивных соединений [5].

Наше исследование было направлено на изучение антимикробной активности 24 штаммов грибов-деструкторов против панели микроорганизмов, предоставленной институтом поиска новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе. Тест проводили по методу культивирования агаровых дисков грибных культур на подложке 16 тест-культур. Активность суммарных метаболитов нитчатых грибов проверяли по диаметру зоны ингибирования роста тест-культур. Культивирование проводили в течение одного дня

<sup>128</sup> Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>129</sup> Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>130</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>131</sup> Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>132</sup> Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>133</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>134</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>135</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>136</sup> Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

для большинства тест-культур и два дня для штаммов *Mycobacterium smegmatis* ВКПМ Ас-1339, *M. smegmatis* мс<sup>2</sup> 155 при 37 °С.

В результате, 16 из 24-х изученных грибных штаммов проявили активность, по крайней мере, против одной из тест-культур. Также были выявлены перспективные штаммы с точки зрения их активности против репрезентативных тест-культур, таких как *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *S. aureus* FDA 209P (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Mycobacterium smegmatis* ВКПМ Ас-1339, *M. smegmatis* мс<sup>2</sup> 155 и *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177. В качестве положительного контроля использовали улучшенные штаммы *Acremonium chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, продуценты цефалоспорина С и ловастина, соответственно. Наиболее перспективными оказались штаммы *Simplicillium lamellicola* STG-96, *Penicillium* sp. STG-327, *Penicillium chrysogenum* STG-344. Антимикробную активность *P. chrysogenum* STG-344 и *Cerarobasidium* sp. STG-324 изучили в двух временных точках, 1 неделя и 2 недели культивирования. Обе отобранные пробы STG-344 проявляли высокую активность против тест-культур; пробы STG-324 показали разную активность против *M. smegmatis* ВКПМ Ас-1339, после недели культивирования выявили высокую активность, затем ее не наблюдали. Штаммы STG-327 и STG-344 показали активность против *P. aeruginosa* ATCC 27853, резистентного против значительного количества натуральных антимикробных соединений. Еще одним перспективным штаммом видится *Aspergillus niger* STG-143В, который проявлял активность против представителей рода *Staphylococcus*. Также против представителей этого рода, в частности против *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA) и *S. aureus* FDA 209P (MSSA), проявили активность штаммы STG-96, *Penicillium chrysogenum* STG-117, STG-327 и STG-344.

Можно сделать вывод, что отобранные штаммы нитчатых грибов из новой малоизученной экологической ниши могут быть использованы в качестве новых источников высокоактивных антимикробных соединений. В частности, штаммы *S. lamellicola* STG-96 и *P. chrysogenum* STG-344, которые показали высокую активность против наиболее интересных тест-культур – *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA), *S. aureus* FDA 209P (MSSA), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *M. smegmatis* ВКПМ Ас-1339, *M. smegmatis* мс<sup>2</sup> 155 и *L. mesenteroides* ВКПМ В-4177.

### Список литературы:

1. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010;1:8040.
2. Zhgun AA. Industrial Production of Antibiotics in Fungi: Current State, Deciphering the Molecular Basis of Classical Strain Improvement and Increasing the Production of High-Yielding Strains by the Addition of Low-Molecular Weight Inducers. *Ferment* 2023, Vol 9, Page 1027
3. Cappitelli F, Cattò C, Villa F. The Control of Cultural Heritage Microbial Deterioration. *Microorganisms*;8:1–20.
4. Capodicasa S, Fedi S, Porcelli AM, Zannoni D. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2010;64:727–33.
5. Zhgun A, Avdanina D, Shumikhin K, Simonenko N, Lyubavskaya E, Volkov I, et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLoS One.* 2020;15:e0230591.

# ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛУТАТИОНА У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* С МНОЖЕСТВЕННОЙ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬЮ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАНАМИЦИНА

Н.С. Жуланова<sup>137, 138</sup>, А.В. Тюленев<sup>139</sup>,  
Г.В. Смирнова<sup>140</sup>, О.Н. Октябрьский<sup>141</sup>

Появление патогенных бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью является серьезной проблемой для современной медицины. Возрастает необходимость как в поиске новых препаратов, так и в разработке подходов, позволяющих более эффективно использовать существующие антибиотики. В связи с этим, актуально изучение механизмов возникновения толерантности у микроорганизмов к антибиотикам.

В последние годы рядом исследователей предположено, что антимикробное действие антибиотиков может быть связано с продукцией активных форм кислорода (АФК). Если это действительно так, то следует ожидать, что факторы, стимулирующие продукцию АФК, будут усиливать действие антибиотиков, и наоборот, факторы нейтрализующие АФК, будут ослаблять их токсичность. Целью настоящей работы было изучение изменений уровней глутатиона у штаммов *Escherichia coli* с множественной антибиотикоустойчивостью при действии антибиотика канамицина.

Трипептид глутатион в клетках различных организмов выступает в роли основного редокс-буфера и принимает участие в регуляции активности многих редокс-чувствительных белков и глобальных стрессовых регуляторов. В аэробных культурах *E. coli* глутатион непрерывно циркулирует между цитоплазмой и окружающей средой. Роль трансмембранной циркуляции в физиологии бактерий не до конца изучена. Известно, что глутатион является активным антиоксидантом и в различных биологических системах принимает участие в защите клеток от окислительного стресса. С другой стороны, накоплены данные о том, что при действии антибиотиков у таких бактерий как *Escherichia coli* наблюдаются значительные изменения статуса внутри- и внеклеточного глутатиона.

<sup>137</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>138</sup> «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

<sup>139</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>140</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>141</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Объект исследования – штаммы *E. coli* АРЕС № 29 (L-5859), №43 (L-5874), №45 (L-5876) возбудители птичьего коллибациллеза, выделенные из внутренних органов цыплят-бройлеров птицефабрик Пермского края. Штаммы депонированы в международной микробной коллекции университета Любляны (Словения) и обладают устойчивостью к ампициллину, ципрофлоксацину и стрептомицину, однако чувствительны к действию канамицина. Культуры бактерий выращивались на среде М9 с 0,2% глюкозы в колбах на 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (37 °С, 150 об/мин). Уровни внутри- и экстраклеточного глутатиона определяли с помощью модифицированного метода Титца, основанного на взаимодействии GSH с реагентом Элмана (DTNB) с образованием окрашенного продукта, поглощающего в области 412 нм. Оптическую плотность ( $OD_{600}$ ) и удельную скорость роста ( $\mu$ ) определяли традиционными способами.

В контрольных условиях, у штаммов L-5859 и L-5874 уровни экстраклеточного глутатиона поддерживались на постоянном уровне до  $OD_{600} = 1,4$ , затем отмечалась его аккумуляция в среде, что может быть связано с переходом культуры к микроаэробным условиям роста. Примечательно, что базовые значения уровня внеклеточного GSH у штаммов L-5859 ( $0,93 \pm 0,14$  мкМ/ $OD_{600}$ ) и L-5876 ( $0,6 \pm 0,17$  мкМ/ $OD_{600}$ ) были в 1,9 и 1,25 раза выше по сравнению с L-5874 ( $0,48 \pm 0,08$  мкМ/ $OD_{600}$ ). Уровни внутриклеточного GSH вначале культивирования у штамма L-5859 был в 1,7 и 2 раз выше  $4,44 \pm 0,44$  мкМ/ $OD_{600}$ ), чем у L-5874 ( $2,87 \pm 0,11$  мкМ/ $OD_{600}$ ) и L-5876 ( $2,42 \pm 0,09$  мкМ/ $OD_{600}$ ) соответственно, однако к окончанию эксперимента различия между штаммами отсутствовали.

В середине экспоненциальной фазы роста ( $OD_{600} = 0,4$ ) культуры обрабатывались 60 мкг/мл канамицина. Двукратное снижение удельной скорости роста ( $\mu$ ) отмечалось через 60 мин после внесения антибиотика у всех испытуемых штаммов, рост бактерий ингибировался полностью через 90 мин экспозиции к антибиотику.

Через 30 мин после обработки канамицином, было отмечено линейное повышение уровней экстраклеточного глутатиона до  $16,2 \pm 0,07$ ,  $21,1 \pm 1,16$  и  $17,1 \pm 0,64$  мкМ/ $OD_{600}$  у штаммов L-5859, L-5874 и L-5876, соответственно. Одновременно, в первые 30 мин с начала экспозиции, отмечалось некоторое повышение уровня внутриклеточного GSH, сменяющееся в дальнейшем снижением до минимальных значений (с  $3,6 \pm 0,8$ ,  $4,4 \pm 0,6$  и  $3,9 \pm 0,7$  мкМ/ $OD_{600}$  до  $0,11 \pm 0,03$ ,  $0,23 \pm 0,02$  и  $0,41 \pm 0,07$  мкМ/ $OD_{600}$  у штаммов L-5859, L-5874 и L-5876 соответственно).

Таким образом, при действии канамицина на *E. coli*, обладающих множественной антибиотикоустойчивостью, наблюдаются значительные изменения как внутриклеточного, так и экстраклеточного уровня GSH. Наблюдается индуцированный антибиотиком сдвиг соотношения уровней внутри- и экстраклеточного глутатиона в сторону усиления экспорта GSH из цитоплазмы в среду культивирования.

*Исследование выполнено согласно гос. заданию №124020500028-4.*

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ УГЛЕРОДНОГО ВОЙЛОКА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ПРИ АНАЭРОБНОМ СБРАЖИВАНИИ СТОЧНОЙ ВОДЫ СВИНОФЕРМЫ В НЕПРЕРЫВНЫХ УСЛОВИЯХ

Е.А. Журавлева<sup>142</sup>, А.А. Лайкова<sup>143</sup>, А.А. Ковалев<sup>144</sup>, Д.А.Ковалев<sup>145</sup>,  
С.В. Шехурдина<sup>146</sup>, Н.Г. Лойко<sup>147</sup>, Е.А. Андреев<sup>148</sup>,  
А.А. Иваненко<sup>149</sup>, Ю.В. Литти<sup>150</sup>

Рост числа животноводческих хозяйств приводит к образованию огромных объемов навоза и сточных вод, представляющих угрозу для окружающей среды. Свиноводство вызывает самые серьезные опасения во всем животноводстве исходя из стремительных темпов роста отрасли. Рациональным способом переработки отходов свиноводства является сепарация твердой и жидкой фракций, где твердая фракция применяется как удобрение, а жидкую – анаэробно сбраживают (АС) [1]. АС является экономически эффективным методом переработки агропромышленных стоков с высоким содержанием загрязняющих веществ, в том числе навозных стоков свиноводства. При АС сложные микробные сообщества разлагают органическое вещество в отсутствие кислорода, образуя биоудобрение и смесь газообразных конечных продуктов, состоящих в основном из  $\text{CH}_4$  и  $\text{CO}_2$  [2]. Одной из стратегий повышения эффективности метаногенеза является стимуляция прямого межвидового переноса электронов (DIET)

<sup>142</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>143</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>144</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>145</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>146</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>147</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>148</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

<sup>149</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>150</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

за счет внесения электропроводящих материалов. DIET между бактериями, окисляющими ЛЖК, и метаногенами при АС позволяет увеличить эффективность производства метана, степень удаления органических веществ, повысить стабильность процесса и обеспечить быстрое восстановление системы после дисбаланса в сравнении с  $H_2$  или формиат-опосредованным межвидовым переносом электронов [3].

Целью данной работы было изучение стимуляции DIET в анаэробных реакторах типа биофильтр в термофильных условиях за счет добавления электропроводящих (карбонный войлок (P2), нержавеющая сталь (P4) и инертных (полиэфирный войлок (P3), стекловолокно (P5) материалов при анаэробной переработке сточной воды свинофермы с высоким содержанием летучих жирных кислот (ЛЖК) с постепенным повышением нагрузки по органическому веществу со средней 4,74 г ХПК/л/сутки до высокой 18,97 г ХПК/л/сутки. Особое внимание было уделено составу микробного сообщества, метаболическим путям протекающих процессов, морфологии и топологии биопленок, электрохимическим показателям процесса и оценке вклада биопленкообразования.

Согласно полученным результатам, средняя скорость образования и выход метана в P2 на  $61,7 \pm 21,3\%$  были выше в сравнении с контролем (P1) и на  $30,9 \pm 16,6\%$  в сравнении с P3 для всех уровней нагрузки. P2 отличался от P1 и P3 по содержанию метана в биогазе на  $10,5 \pm 4,5\%$  и  $7,1 \pm 5,9\%$  в среднем для всех уровней. В ходе эксперимента лучшие показатели по степени удаления ХПК были у P2, однако при нагрузке 9.49 г ХПК/л/сутки степень удаления ХПК была самой высокой у P1. Степень накопления ЛЖК была самой низкой в P2 и в среднем составляла  $1,89 \pm 1,68$  г/л, когда в P1 и P3 была равна  $2,74 \pm 1,10$  и  $2,58 \pm 2,04$  г/л соответственно. В P4 и P5 среднее накопление ЛЖК было выше и составляло  $3,53 \pm 1,53$  и  $3,87 \pm 1,52$  г/л, соответственно. рН был постоянен во всех реакторах, и в среднем не опускался ниже  $8,82 \pm 0,31$ . Однако для первых двух стадий рН составил  $9,09 \pm 0,04$  (4.74 и 9.49 г ХПК/л/сутки), а при переходе к нагрузкам 14,23 и 18,97 г ХПК/л/сутки средние значения рН снизились и составили  $8,54 \pm 0,19$ . Содержание аммония и фосфата было стабильным для всех реакторов на протяжении всего эксперимента и в среднем составило  $530,2 \pm 31,7$  и  $19,6 \pm 1,9$  мг/л, соответственно. С помощью сканирующей электронной микроскопии в биопленках на всех материалах-носителях были выявлены пилеподобные структуры разной длины и диаметра (не превышал 50 нм), относительная численность которых повышалась с увеличением нагрузки. Согласно результатам конфокальной лазерной сканирующей микроскопии толщина и объем биопленок возрастали с повышением нагрузки, но отношение площади биопленки к объему, характеризующее контакт с окружающей средой, было наибольшим на третьем этапе эксперимента для всех реакторов. Исходя из результатов циклической вольтамперометрии, прирост заряда для биопленок на карбоновом войлоке был наибольшим для первого и четвертого этапов эксперимента, что указывает на заметное усиление электрон-транспортных свойств и электроактивности микробного сообщества. Доминирующим представителем архейного сообщества для всех реакторов на всех уровнях нагрузки были гидрогенотрофные метаногены рода

*Methanothermobacter*, за исключением P1, в котором постепенно увеличивалась относительная численность рода *Methanosarcina*. Основными доминирующими представителями бактериального сообщества всех реакторов на всех уровнях нагрузки были предположительно электроактивные бактерии групп *Clostridium sensu stricto* 1 и *Limnochordia* MBA03. Несмотря на довольно близкие показатели, для P2 при предсказании основных метаболических функций наблюдалось повышение показателей производства и преобразования энергии в сравнении с P3, что может быть напрямую связано со стимуляцией DIET.

На основании биотехнологических, электрохимических и микробиологических параметров, карбоновый войлок (P2) существенно улучшает эффективность процесса АС сточной воды свинофермы с высоким содержанием ЛЖК за счет активизации DIET. Полученные результаты в перспективе позволят масштабировать технологию анаэробной переработки стоков животноводства, увеличить скорость разложения органического вещества и производства метана за счет подбора оптимального материала-носителя.

#### **Список литературы:**

1. Zhang, Y., Bo, Q., Ma, X., Du, Y., Du, X., Xu, L., & Yang, Y. Solid-Liquid Separation and Its Environmental Impact on Manure Treatment in Scaled Pig Farms-Evidence Based on Life Cycle Assessment //Agriculture. – 2023. – V. 13. – №. 12. – P. 2284.
2. Lourinho G., Rodrigues L., Brito P. S. D. Recent advances on anaerobic digestion of swine wastewater // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2020. – V. 17. – №. 12. – P. 4917–4938.
3. Baek G., Lee C., Yoon J. Machine learning approach for predicting anaerobic digestion performance and stability in direct interspecies electron transfer-stimulated environments //Biochemical Engineering Journal. – 2023. – V. 193. – P. 108840.

*Работа выполнена при поддержке гранта  
НЦМУ «Агротехнологии будущего» № 075-15-2022-318.*

# АКТИВНОСТЬ АЗОТФИКСАЦИИ В РИЗОСФЕРЕ *VACCINIUM CORYMBOSUM L.*, ВОЗДЕЛЫВАЕМОЙ НА ВЫРАБОТАННЫХ ТОРФЯНИКАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С УДОБРЕНИЯМИ

С.П. Зимич<sup>151</sup>, Г.И. Булавко<sup>152</sup>, А.П. Яковлев<sup>153</sup>

Для формирования высокого и качественного урожая растение должно быть обеспечено в достаточной мере азотом. Не исключением являются многие ягодные культуры. При возделывании саженцев поступление азота обеспечивается либо при внесении минеральных удобрений, либо же благодаря биологической фиксации азота. Ежегодное внесение минеральных удобрений может вызывать загрязнение окружающей среды, т.к. только 25% способно усвоить само растение. Остальная часть переходит в недоступную для него форму и токсичную для окружающей среды, тем самым снижая плодородие почвы, либо попадая в грунтовые воды, оказывает пагубное влияние. При возделывании голубики высокорослой (*V. corymbosum*) биологическая фиксация азота происходит за счет ассоциативных азотфиксирующих diaзотрофов. В связи с этим, целью данной работы было изучение процессов азотфиксации в ризосфере растений голубики, возделываемой на выработанных торфяниках при внесении минеральных, органических и микробных удобрений.

Полевой эксперимент заложен на площадях, выбывшего из промышленной эксплуатации торфяного месторождения «Журавлевское» в северной агроклиматической зоне Беларуси. Отбор торфа осуществляли под посадками 3-летних саженцев голубики высокорослой сортов *Denis Blue* (среднеспелый) и *Northland* (раннеспелый). Схема опыта состояла из 4 вариантов: 1 – контроль (без обработки), 2 – Basacot Plus 6 N16P8K12 (минеральное удобрение), 3 – ЭкоГум-комплекс (органическое удобрение), 4 – МаклоР в концентрации 10% (микробное удобрение). Образцы торфа для анализа отбирали 3 раза за вегетационный период на протяжении 2020-2021 гг.

Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом [1] на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором Хромос ГХ-1000. Колонка была за-

<sup>151</sup> ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2в.  
E-mail: antohina\_lana@mail.ru

<sup>152</sup> ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2в.  
E-mail: antohina\_lana@mail.ru

<sup>153</sup> ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2в.  
E-mail: antohina\_lana@mail.ru

полнена сорбентом силикагелем. Температура колонки – 70 °С. Газом-носителям служил гелий. Предварительную навеску (3 г торфа) просеивали и удаляли мелкие корешки, затем помещали в пенициллиновый флакон. Вносили раствор 2% глюкозы и стерильную воду, доводя влажность субстрата до 60%. Образцы в пенициллиновых флаконах закрывали ватными пробками и оставляли в термостате на сутки с поддерживающей температурой 28 °С. Через сутки инкубации ватные пробки заменяли на резиновые с использованием зажимов для более плотной фиксации и вводили по 1 мл ацетилена, и оставляли инкубироваться еще на 1 час в термостате [2]. После истечения времени из каждого флакона отбирали пробы по 1 мл и вводили в колонку газового хроматографа. Все варианты исследования проверяли в трехкратной повторности. Статистическая обработка экспериментального материала проводилась с использованием пакета анализа данных *MS Office Excel*.

В ходе эксперимента установлено, что в первый год для голубики сорта *Denis Blue* во всех вариантах опыта процесс азотфиксации в ризосфере опытных растений был максимальным в середине вегетационного периода (июль). При этом, относительно контрольного варианта внесение удобрений увеличивало активность азотфиксации: для минерального удобрения – на 24–68%, органического – на 41–138%, микробного – на 53–151% за весь вегетационный период. Аналогичная закономерность выявлена и во второй год исследований, когда осязаемый положительный эффект на процесс азотфиксации под посадками голубики сорта *Denis Blue* выявлен при обработке микробным удобрением, превышавшим контрольный вариант на 52–264%.

Активность азотфиксации под посадками голубики раннеспелого сорта *Northland* при обработке удобрениями была не столь выраженной. В первый год исследования при обработке минеральным удобрением активность изучаемого показателя превышала контроль на 5–72%, органическим – 31–39%, микробным – 6–44%. Во второй год исследования максимальная активность азотфиксации для данного сорта наблюдалась месяцем ранее (в июне), чем для *Denis Blue*, и превышала контроль в варианте с обработкой органическим удобрением ЭкоГум-комплекс (на 102%).

Таким образом, результаты полевого эксперимента свидетельствуют о сортоспецифичности активности процесса фиксации азота в посадках ранне- и среднеспелого сортов голубики. Во-первых, для растений сорта *Northland* максимальные показатели азотфиксации были в 1,6–2,5 раза ниже, чем у среднеспелого сорта *Denis Blue*. Во-вторых, пик активности изучаемого показателя у раннеспелого сорта приходится на начало сезона вегетации (июнь), тогда как *Denis Blue* на его середину. В-третьих, эффективность изучаемых агроприемов на азотфиксацию для различных видов удобрений у опытных растений была различной: максимальные характеристики в сезонной динамике азотфиксации относительно контрольного варианта установлены при внесении 10%-ного рабочего раствора микробного препарата МаКлоР в посадках *Denis Blue*. Тогда как у растений сорта *Northland* – при обработке их 1% рабочим раствором органического удобрения ЭкоГум-комплекс. На наш взгляд, выявленные закономерности

обусловлены сроком созревания сортов и биологией их развития. При этом показано, что использование удобрения разного типа (минеральное, органическое, микробное) положительно влияет (в большей либо меньшей степени) на процесс азотфиксации под саженцами голубики высокорослой.

**Список литературы:**

1. Умаров, М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М. М. Умаров // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.
2. Практикум по биологии почв : Учебное пособие / Г. М. Зенова [и др.]. – М. : Издательство МГУ, 2002. – 120 с.

# ВОЗДЕЙСТВИЕ ТРЕМАТОДЫ *MICROPHALLUS PYGMAEUS* НА ГОЛОБИОНТА

Е.В. Зубова<sup>154</sup>, Е.Р. Гафарова<sup>155</sup>, Д.С. Курячий<sup>156</sup>,  
Е.А. Репкин<sup>157, 158</sup>, А.И. Гранович<sup>159</sup>

В качестве промежуточных хозяев трематоды рода *Microphallus* используют различных гастропод (Mollusca: Gastropoda). Эти паразиты могут оказывать влияние на множество аспектов жизни своих хозяев, включая метаболизм, размножение, питание и движение. Инфицирование спороцистами этих трематод может привести к изменению размера и формы раковины моллюсков, а также изменить их поведение и вызвать паразитарную кастрацию. Хотя влияние трематод на поведение, морфологию и физиологию промежуточных хозяев было достаточно хорошо изучено, влияние этих паразитов на бактериальную микрофлору хозяев оставалось неизученным. Важность этого аспекта взаимодействий паразит-хозяин становится все более очевидной в последние годы, особенно с учетом новых представлений о значительной роли микробных сообществ в определении ключевых характеристик организма хозяина (концепция голобионта). Таким образом, микроорганизмы, входящие в состав организма хозяина, могут играть определяющую роль в понимании механизмов формирования и устойчивости системы паразит-хозяин, предоставляя новые перспективы для исследований в области экологии и паразитологии.

В нашем исследовании мы рассматривали морских литоральных гастропод *Littorina saxatilis* и *Littorina obtusata*, а также микробиом их пищеварительной системы, чтобы проанализировать влияние трематод *Microphallus pygmaeus* на голобионта. Мы предположили, что моллюски и их микробиом могут реагировать на заражение трематодами как единое целое. В качестве начального исследования для проверки этой гипотезы мы решили выяснить, как заражение *M. pygmaeus* влияет на микробиом пищеварительной системы моллюсков. В августе 2021 года на побережье Баренцева моря были собраны 56 образцов кишечника (фрагменты задней кишки зараженных и незараженных *L. obtusata* и *L. saxatilis* с верхнего и нижнего уровней литорали, по 7 повторностей). Для анализа состава кишечного микробиома неинфицированных и инфицированных

<sup>154</sup> Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>155</sup> Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>156</sup> Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>157</sup> Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>158</sup> Research Park, Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>159</sup> Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, 199034 Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, Russia

*M. pygmaeus* моллюсков обоих видов был использован метод 16S рДНК метабаркодинга. Результаты исследования продемонстрировали, что состав кишечных бактерий значительно отличается как между зараженными и незараженными улитками, так и между видами *L. saxatilis* и *L. obtusata*, но при этом мы не наблюдали различий в микробиоме этих видов в зависимости от уровня литорали. Бактерии рода *Nitrosolobaceae* были более характерны для *L. obtusata*, в то время как бактерии рода *Rhizobiaceae* чаще встречались у *L. saxatilis*. В бактериомах кишечника обоих видов моллюсков заражение *M. pygmaeus* приводило к снижению численности бактерий из родов *Psychromonas*, *Psychrilyobacter* и *Halochromatium*. Мы предполагаем, что уменьшение числа этих бактерий может негативно сказаться на способности моллюсков рода *Littorina* переваривать пищу, что может ухудшить метаболизм моно- и олигосахаридов. В кишечнике зараженных моллюсков также наблюдалось увеличение численности бактерий рода *Mycoplasma*, что может свидетельствовать о повышенной вероятности сопутствующих инфекций при трематодозе, поскольку представители этого рода в основном являются патогенными организмами.

Изменения в таксономическом составе кишечного микробиома *Littorina saxatilis* и *L. obtusata*, вызванные инвазией *Microphallus pygmaeus*, подчеркивают важность анализа микрофлоры хозяев при изучении взаимодействий в системах паразит-хозяин. Эти закономерности подтверждают, что применение концепции голобионта может быть весьма перспективным для глубокого анализа отношений между паразитами и их хозяевами. Дальнейшие исследования в этой области могут открыть новые горизонты для понимания механизмов взаимодействия и адаптации в экосистемах, а также предложить новые подходы к контролю паразитарных инфекций.

# НОВЫЙ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЙ ШТАММ *SALISEDIMINIBACTERIUM* MB1000, СПОСОБНЫЙ ЭФФЕКТИВНО ВОССТАНАВЛИВАТЬ ХРОМАТ

А.В. Игнатенко<sup>160</sup>, Т.В. Хижняк<sup>161</sup>

Ежегодно в окружающую среду попадает более 2,5 млн. т/г хромсодержащих промышленных отходов, включающихся в геохимический круговорот внутри биосферы [1]. Основной формой при этом является токсичный  $\text{CrO}_4^{2-}$ , обладающий мутагенным и канцерогенным действием. На сегодняшний день известно лишь несколько десятков штаммов бактерий, способных эффективно восстанавливать  $\text{Cr(VI)}$  [2–4]. При этом биохимический процесс его восстановления остается малоизученными. Исследование хемолитогетеротрофных бактерий содовых мест обитаний, способных проводить специфические окислительно-восстановительные реакции с хромом практически не проводилось.

В ходе предыдущих исследований выделенного нами штамма *Salisediminibacterium* MB1000 было показано, что он способен использовать  $\text{Cr(VI)}$  в качестве единственного акцептора электронов при анаэробном культивировании на минеральной содово-хлоридной среде [5]. Был определен диапазон и оптимум температуры и pH, а так же показана возможность использования штамма в простейших биореакторах для очистки среды от  $\text{Cr(VI)}$ .

Важным параметром для организмов, обитающих в соленых щелочных условиях, является соотношение хлорид и карбонат ионов в растворе. Согласно полученным нами результатам увеличение доли карбонатов в среде увеличивает диапазон солености, при которой возможен рост культуры и восстановление хроматов. При соотношении  $([\text{Na}_2\text{CO}_3] + [\text{NaHCO}_3]) / [\text{NaCl}] = 0,125$  рост наблюдается в области 1–2,5 М по  $\text{Na}^+$ , а при соотношении солей 3 – штамм растет в диапазоне 0,5–4 М по  $\text{Na}^+$ .

Результаты мультисубстратного тестирования доноров электронов показали, что штамм MB1000 способен расти на глюкозе, глицерине, сахарозе, фруктозе, формиате, дрожжевом экстракте, пептоне, пирувате, крахмале и лактате в присутствии хромата в качестве акцептора. При этом, необходимым для роста культуры является присутствие в среде дрожжевого экстракта в количестве не менее 25 мг/л.

Помимо  $\text{Cr(VI)}$  выделенный штамм способен использовать в качестве акцептора электрона нитрат, нитрит, селенит, элементный селен, теллурид, ДМСО и кислород.

<sup>160</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>161</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Восстановление теллура протекает с образованием нерастворимого осадка  $\text{Te}^0$ , который частично выпадает на дне пенициллинового флакона, частично сорбируется на стеклянных стенках, образуя налет металлического цвета (рис. 1). При культивировании на селените наблюдается сначала образование аморфного осадка  $\text{Se}^{+4}_{(p)} \rightarrow \text{Se}^0_{(oc)}$  (красный), который со временем растворяется с образованием окрашенного раствора полиселенида  $n\text{Se}^0_{(oc)} \rightarrow (\text{Se}^{-2})_{n(p)}$ . Полиселенид так же образуется при культивировании на элементарном селене.

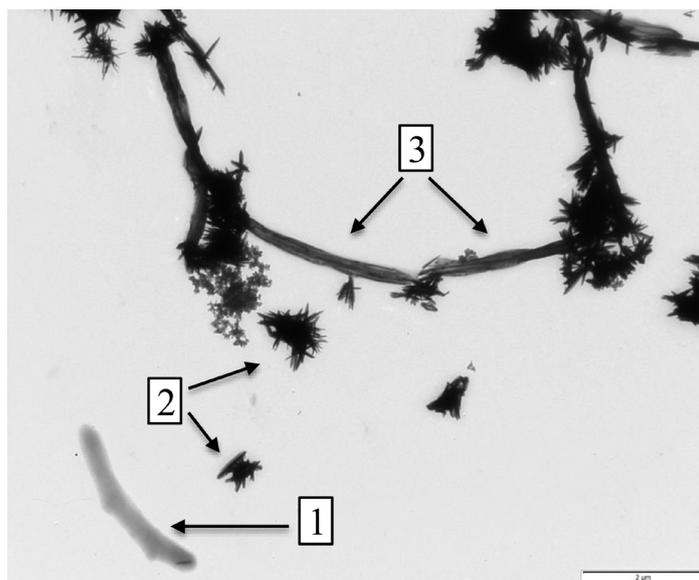


Рис. 1. Электронная фотография культуры MB1000 на 10 сутки культивирования с лактатом и теллуридом в качестве донора и акцептора электронов (Jeol JEM-1400). Цифрами обозначены: 1 – живые клетки; 2 – осадок  $\text{Te}^0$ ; 3 – мертвые клетки покрытые слоем  $\text{Te}^0$

Предварительные результаты геномного анализа показывают наличие у штамма MB1000 ферментов, ответственных за восстановление селенита, теллурида и нитрата. Найдены белки ответственные за транспорт хрома из клетки, а так же ряд ферментов, потенциально задействованных в восстановление  $\text{Cr(VI)}$  до  $\text{Cr(III)}$ . Планируемые дальнейшие исследования генома помогут установить биохимический механизм восстановления хрома и однозначно выделить ответственные за него ферменты (Тоцаков С.В., лаборатория "Геномная фабрика" Курчатковского института).

На основе полученных данных штамм *Salisediminibacterium* MB1000 готовится к валидному описанию в качестве нового вида.

### Список литературы:

1. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах // 2009. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии.
2. Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review // Journal of Environmental Management. 2021. V. 287. 112279

3. Barrera-Diaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction // Journal of Hazardous Materials. 2012. V. 223–224. P. 1–12.
4. Dhal B., Thatoi H.N., Das N.N., Pandey B.D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review // Journal of Hazardous Materials. 2013. V. 250–251. P. 272–291.
5. Ignatenko A.V., Khizhnyak T.V. A new haloalkaliphilic member of the genus Salisediminibacterium capable of efficient chromate reduction // Microbiology. 2024. Vol. 93. N 2. P. 163–166.

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕХАНИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СПОР *TUBER AESTIVUM*

Н.А. Имидоева<sup>162</sup>, Е.В. Малыгина<sup>163</sup>, А.Ю. Бельшенко<sup>164</sup>,  
М.Е. Дмитриева<sup>165</sup>, Т.Н. Вавилина<sup>166</sup>, Д.В. Аксёнов-Грибанов<sup>167</sup>

Среди всего разнообразия грибов, изученных в отношении биомедицинских свойств, одними из наименее исследованных являются трюфельные грибы. Трюфельводство представляется одной из важных, актуальных и в то же время высоко проблемных областей современного грибоводства. В настоящее время число истинных трюфельных грибов, собираемых в дикой природе, снижается. Трюфельные грибы являются уникальным и ценным продуктом и пользуются большим спросом в кулинарии из-за наличия характерного вкуса и аромата. Помимо этого, трюфели обладают уникальными требованиями к климату и почве, что делает их редкими и труднодоступными. Помимо этого, одним из важнейших условий распространения трюфелей в дикой природе является высвобождение спор из асков, которые служат защитной оболочкой, защищающей споры от негативных воздействий. В них происходит активное созревание спор трюфеля. Когда зрелые споры выходят из асков, они прорастают, образуя микоризу с корнями растений, после чего идет формирование плодовых тел. Однако, в последние десятилетия наблюдается заметное уменьшение количества дикорастущих трюфелей. В связи с этим одним из перспективных направлений исследований является разработка методов выращивания трюфельных грибов в лабораторных условиях.

Так, целью исследования являлась разработка эффективного и доступного метода разрушения асков для оптимизации методов получения чистых культур трюфеля и их культивирования. В результате выполненных экспериментов были разработаны два наиболее экологичных метода получения спор трюфеля, такие как, механический и биологический. Механическую гомогенизацию плодовых тел проводили с помощью погружного блендера в сочетании с шаровой мельницей, которая показала свою эф-

<sup>162</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>163</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>164</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>165</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>166</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>167</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

фективность и привела к разрушению не менее 85% асков и высвобождению спор. Механический способ активации спор позволяет лучше контролировать количество спор трюфеля и их распределение в инокуляте для подсаживания к рассадам растений и дальнейшего выращивания данных грибов.

Биологический метод активации спор осуществляли при помощи африканских и виноградных улиток. Показано, что аски разрушаются и споры высвобождаются под действием ферментов в пищеварительном тракте брюхоногих моллюсков. Споры трюфеля изменили свою морфологию после прохождения через желудочно-кишечный тракт брюхоногих моллюсков. Споры стали более округлыми и рыхлыми, изменился их сетчатый рисунок. Биологический метод также имеет ряд преимуществ, поскольку брюхоногие моллюски - доступные и широко распространенные организмы. Содержание моллюсков не требует много места и специального ухода, что снижает затраты на получение активированной споровой суспензии и дальнейшее выращивание трюфелей. Данный метод активации спор является экологически безопасным и устойчивым, поскольку не требует применения редких или труднодоступных химических реагентов, редких растительных экстрактов и т.д., что снижает его воздействие на окружающую среду.

Положительный эффект от механической и биологической предварительной обработки был подтвержден прорастанием спор трюфеля *in vitro* на агаризованной питательной среде, а также микроскопическими наблюдениями. Использование данных методов может быть полезно для обеспечения эффективного и быстрого прорастания спор трюфелевых грибов на различных субстратах в лабораторных условиях. Разработанные методы могут быть применены в грибоводстве и будут полезны при массовом культивировании черного трюфеля.

*Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 22-76-10036.*

# TsA *THERMOCOCCUS SIBIRICUS* КАК ПРИМЕР ПЕРСПЕКТИВНОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ЭКСТРЕМОФИЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

С.Г. Калинин<sup>168</sup>, М.В. Думина<sup>169</sup>

L-аспарагиназа (L-АСП) катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака и является важным ферментом для жизнедеятельности микроорганизмов. Образующийся в результате реакции аспартат является одним из ключевых метаболитов, воздействующих на многие биохимические процессы в клетке. L-АСП различных типов обнаружены в микроскопических грибах, микроводорослях, бактериях, археях [1].

В течение многих лет L-АСП сохраняет свою биотехнологическую значимость как препарат терапии онкозаболеваний. Новой сферой применения фермента является пищевая промышленность. При высокотемпературной термической обработке между аспарагином и восстанавливающими сахарами протекает реакция Майяра, в результате которой в пищевых продуктах образуется ряд канцерогенных производных, в частности, акриламид [2]. L-АСП, гидролизуя аспарагин, способна эффективно снижать их содержание.

Ввиду широкой распространенности в природе, ведется непрерывный поиск новых перспективных для биотехнологии форм фермента. Для высокотемпературных пищевых технологий интерес представляют L-АСП термофильных микроорганизмов. Ранее нами была проведена экспрессия L-АСП из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* TsA в клетках *Escherichia coli*, изучены ее биохимические свойства [3]. Целью данной работы стало изучение способности TsA из гипертермофила *T.sibiricus* снижать содержание акриламида в хлебобулочных изделиях, полученных при выпекании с использованием модельной рецептуры.

Для оценки эффекта гипертермофильной L-АСП была использована многокомпонентная система, содержащая крахмал, глюкозу, фруктозу, L-аспарагин и воду. Предобработку полученной гомогенной пастообразной смеси проводили с добавлением фермента TsA 20 МЕ/мл, а также без (контроль) при 85 °С в течение 15 минут. Выпекание образцов проводили при 190 °С в течение 30 минут.

<sup>168</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>169</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Согласно результатам ВЭЖХ-анализа, содержание акриламида в экстрактах, полученных из измельченного материала, составило: контроль – 173,5 мкг/л; образцы, обработанные TsA 20 МЕ/мл – 1,8 мкг/л (Рисунок 1а). Таким образом, было показано, что L-АСП из гипертермофила *T.sibiricus* способна эффективно гидролизовать L-аспарагин в модельной многокомпонентной системе. Предобработка ферментом образцов, выпекаемых при 190 °С, снизила содержание акриламида более чем на 98% в сравнении с контролем.

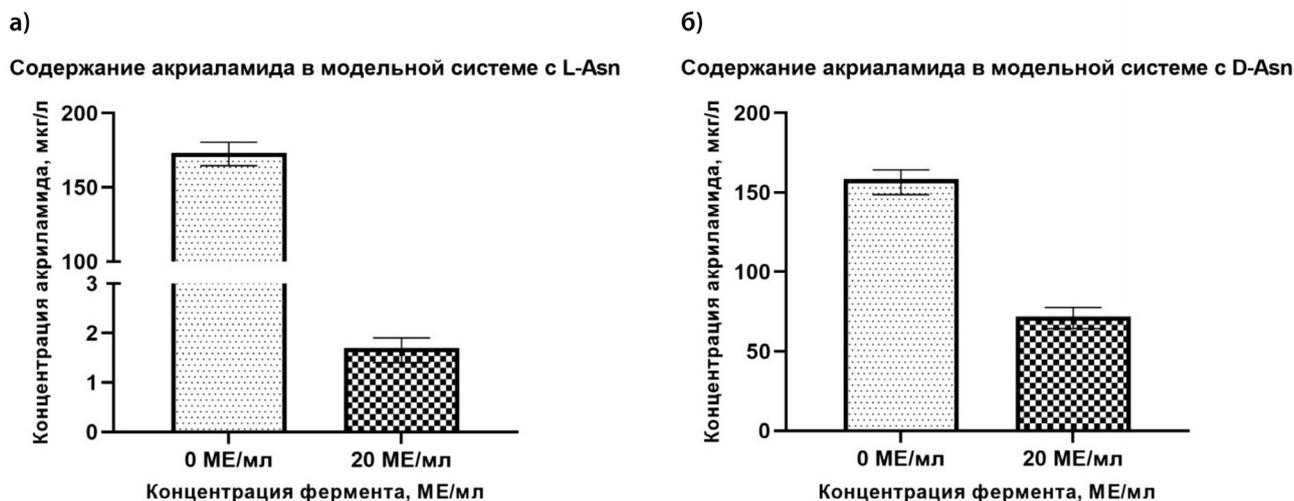


Рис. 1. Содержание акриламида в модельных системах с L-аспарагином (а) и D-аспарагином (б)

Согласно литературным данным, в продуктах питания, помимо L-аминокислот, содержатся аминокислоты в D-форме. Выявлено, что при термической обработке хлебобулочных изделий повышается содержание D-изомеров аминокислот [4].

L-АСП различного происхождения характеризуются варьированием субстратной специфичности, в частности, ряд ферментов имеют сопутствующую D-аспарагиназную активность. Способность L-АСП из гипертермофила *T.sibiricus* гидролизовать D-аспарагин исследовали, используя описанную выше систему, где L-аспарагин был заменен на D-аспарагин. ВЭЖХ анализ показал, что в контрольных образцах с D-аспарагином, не подвергаемых предобработке ферментом TsA, количество акриламида аналогично образцам, содержащим L-аспарагин. L-АСП TsA показала способность катализировать расщепление D-аспарагина, снижая уровень образуемого акриламида (Рисунок 1б). Добавление фермента приводило к снижению акриламида более чем на 54% по сравнению с контролем.

Полученные на модельной системе результаты свидетельствуют о высокой активности фермента в снижении акриламида, а также способности расщеплять смесь L- и D-аспарагина, являющихся субстратами для неэнзиматического синтеза токсичных производных реакции Майяра.

Представители рода *Thermococcus* – филогенетически обособленная и самая многочисленная группа термофильных/гипертермофильных архей с широким диапазоном

температур роста – 55-95 °С [5]. С биотехнологической точки зрения это одна из самых перспективных групп экстремофильных микроорганизмов. Изучение свойств L-АСП TsA из гипертермофильной анаэробной археи *T. sibiricus*, выделенной из высокотемпературного нефтяного месторождения при температуре 84 С, показало ее высокий потенциал для применения в высокотемпературных пищевых процессах для снижения содержания потенциально канцерогенных для человека соединений.

### **Список литературы:**

1. Marília Crivelari da Cunha, Jessika Gonçalves dos Santos Aguilár , Ricardo Rodrigues de Melo, Sheila Tiemi Nagamatsu, Faraat Ali, Ruann Janser Soares de Castro, Hélia Harumi Sato Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications // Food Research International Volume 126, December 2019, 108658. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108658
2. Mendel Friedman Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review // J Agric Food Chem. 2003 Jul 30;51(16):4504-26. doi: 10.1021/jf030204+
3. Dumina M, Zhgun A, Pokrovskaya M, Aleksandrova S, Zhdanov D, Sokolov N, El'darov M.A Novel L-Asparaginase from Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus sibiricus: Heterologous Expression and Characterization for Biotechnology Application // Int J Mol Sci. 2021 Sep 13;22(18):9894. doi: 10.3390/ijms22189894
4. Jutta Zagon, Lutz-Ingo Dehne, Klaus-Werner Bogl D-amino acids in organisms and food // Nutrition Research, Vol. 14, No. 3, pp. 445–463, 1994
5. Li J., Wang J., Bachas L.G. Biosensor for asparagine using a thermostable recombinant asparaginase from *Archaeoglobus fulgidus* // Anal. Chem. – 2002.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда  
(проект № 22-74-10100, <https://rscf.ru/project/22-74-10100/>)  
в Федеральном исследовательском центре  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук*

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБИТАЕМОЙ СРЕДЫ РОССИЙСКОГО СЕГМЕНТА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

К.В. Кантор<sup>170</sup>, А.В. Сидоренко<sup>171</sup>

Международная космическая станция (МКС) представляет собой замкнутую среду обитания, где микроорганизмы непрерывно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов. Для многих штаммов дрожжей, выделенных с различных поверхностей МКС, показано наличие свойств, связанных с адаптацией к холоду, радиации и другим стресс-факторам [1]. Целью данного исследования являлась идентификация и изучение физиологических особенностей дрожжевых культур S6/13 и S6/14, выделенных при проведении микробиологического мониторинга обитаемой среды Российского сегмента МКС.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК показал, что изолят S6/13 относится к роду *Rhodotorula* (99,76%), а изолят S6/14 – к роду *Naganishia* (99,99%). Следует отметить, что представители рода *Rhodotorula* являются наиболее распространенными дрожжевыми грибами, обнаруживаемыми на поверхностях МКС [2].

Установлено, что обе культуры растут на сусло-агаре в диапазоне температур 4–24 °С с оптимумом 24 °С, что позволяет отнести их к факультативным психрофилам. Изолят *Rhodotorula* sp. S6/13 демонстрировал также слабый рост при 37 °С.

Для обоих изолятов отмечен уверенный рост по штриху с образованием колоний на среде с 9% NaCl и уверенный рост по штриху без образования колоний на среде с 12% соли, что позволяет говорить о высокой галотолерантности изучаемых культур.

При изучении устойчивости к ультрафиолетовому излучению (длина волны 254 нм, расстояние до УФ-лампы – 22 см, время экспозиции – до 15 минут) установлено, что предел выживаемости обеих культур дрожжей составляет 5 минут, что является сравнительно невысоким значением [3].

Тестирование устойчивости к тяжелым металлам ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$  в концентрации 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1%) показало, что изолят *Naganishia* sp. S6/14 устой-

<sup>170</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>171</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

чив ко всем изучаемым концентрациям сульфата меди, тогда как рост культуры *Rhodotorula S6/13* замедляется в присутствии 0,05% данного соединения и отсутствует при его концентрации 0,1%. При добавлении в среду хлорида ртути в количестве 0,01, 0,025 и 0,05% изучаемые штаммы растут по штриху без образования колоний; при этом более активный рост отмечен для изолята *Rhodotorula S6/13*. Внесение в среду 0,1%  $\text{HgCl}_2$  подавляет рост обеих исследуемых культур дрожжей. В то же время штаммы *Naganishia* sp. S6/14 и *Rhodotorula S6/13* устойчивы сульфату никеля в концентрации 0,01–0,1%.

По результатам качественных тестов для обеих культур выявлена протеолитическая, целлюлолитическая и липолитическая активность (высокая – на среде с твином-20, слабая – на среде с твином-80), способность к гидролизу крахмала не обнаружена.

### Список литературы:

1. Bijlani S, Parker C, Singh NK, Sierra MA, Foox J, Wang CCC, Mason CE, Venkateswaran K. Genomic Characterization of the Titan-like Cell Producing *Naganishia tulchinskyi*, the First Novel Eukaryote Isolated from the International Space Station. *J Fungi (Basel)*. 2022 Feb 8;8(2):165. doi: 10.3390/jof8020165.
2. Daudu R, Parker CW, Singh NK, Wood JM, Debieu M, O'Hara NB, Mason CE, Venkateswaran K. Draft Genome Sequences of *Rhodotorula mucilaginosa* Strains Isolated from the International Space Station. *Microbiol Resour Announc*. 2020 Jul 30;9(31):e00570-20. doi: 10.1128/MRA.00570-20.
3. Ezaka, Emmanuel & Nchedo, O. & Nnabuike, Ugbo & Adediran, A.B. & Ayanda, O.E.. (2021). Effects of Environmental factors on the Growth and Proliferation of Yeasts. *Nigerian Journal of Biotechnology*. 38. 166–178. 10.4314/njb.v38i1.20.

# ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕТЕРОТРОФНЫХ НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ АКТИВНОГО ИЛА

Н.И. Кириллова<sup>172, 173</sup>, Т.В. Вдовина<sup>174</sup>, А.С. Сироткин<sup>175</sup>

Процесс нитрификации является важнейшим в системе биологической очистки сточных вод от соединений аммония. Традиционно биологическое удаление азота в системах очистки сточных вод включает в себя сочетание процессов окисления аммония до нитритов аэробными хемолитоавтотрофными нитрифицирующими микроорганизмами в аэробных условиях, а также денитрификацию, в которой продукты нитрификации восстанавливаются до газообразного азота денитрифицирующими микроорганизмами в анаэробных условиях.

В последние два десятилетия накапливается богатый экспериментальный материал и формируются представления о новых механизмах микробной трансформации азота в микробных консорциумах. Согласно современным исследованиям биологическое удаление аммонийного азота может быть реализовано в процессе гетеротрофной нитрификации. Гетеротрофные нитрифицирующие бактерии (ГНБ) имеют ряд преимуществ по сравнению с автотрофными микроорганизмами, таких как одновременное удаление органических веществ и аммонийного азота, высокая скорость роста и метаболическую активность. Таким образом, потенциал ГНБ может обеспечить дальнейшее развитие технологий нитрификации сточных вод [1,2].

Исследуемые гетеротрофные нитрифицирующие бактерии были выделены из активного ила очистных сооружений с. Кошачово (Республика Татарстан). Выделение изолятов осуществлялось на базовой среде следующего состава (в г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,75;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 0,25;  $\text{MgSO}_4$  – 0,03;  $\text{MnSO}_4$  – 0,01;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 5,0 [3]. На этапе выделения микроорганизмов качественную принадлежность изолятов к ГНБ оценивали на основании накопления в среде нитрит-ионов, подтверждаемого их реакцией с реактивом Грисса. Описание культуральных и морфологических признаков выделенных изолятов представлено в таблице 1.

Аммонийокисляющая способность выделенных ГНБ была оценена в процессе их периодического культивирования в колбах Эрленмейера при температуре

<sup>172</sup> Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов ФИЦ КазНЦ РАН

<sup>173</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет

<sup>174</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет

<sup>175</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет

28 °С и перемешивании 120 об/мин в среде, моделирующей коммунально-бытовые сточные воды.

Таблица 1.

Культуральные и морфологические признаки  
выделенных гетеротрофных нитрифицирующих бактерий

Изолят	Размер колонии, мм	Форма колонии	Цвет колонии	Рельеф колонии	Характер поверхности	Форма клетки	Окраска по Граму
BM1.1	3	круглая	бежевый	плоский	матовый	палочки	Гр-
BM1.2	3	круглая	бежевый	плоский	блестящий	палочки	Гр-
BM2	< 0,5	круглая	прозрачный	плоский	блестящий	палочки	Гр+

На основании секвенирования 16S рРНК выделенных бактерий были получены последовательности нуклеотидов, позволившие отнести исследуемые изоляты гетеротрофных нитрифицирующих бактерий к видам *Pseudochrobactum asaccharolyticum*, *Alcaligenes faecalis* и *Leucobacter aridicollis* (NCBI GenBank) (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты идентификации бактерий  
на основании секвенирования последовательности 16S рРНК

Изолят	Микроорганизм	% соответствия (NCBI GenBank)
BM1.1	<i>Pseudochrobactum asaccharolyticum</i>	99,85
BM 1.2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100
BM2	<i>Leucobacter aridicollis</i>	100

Выделенные штаммы гетеротрофных нитрифицирующих бактерий являются перспективными объектами для интенсификации процессов нитрификации в условиях биологической очистки сточных вод.

### Список литературы:

1. Yang, M. Carbon and nitrogen metabolic pathways and interaction of cold-resistant heterotrophic nitrifying bacteria under aerobic and anaerobic conditions. / M. Yang, D. Lu, J. Yang, Y. Zhao, Q. Zhao, Y. Sun, H. Liu, J. Ma // Chemosphere. – 2019. – Vol. 234. – p. 162–170.
2. Xie, F. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49 / F. Xie, M. Thiri, H. Wang // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 319, 124198.
3. Lu, Y. Isolation and Characterization of Heterotrophic Nitrifying Strain W1 / Y. Lu, X. Wang, B. Liu, Y. Liu, X. Yang // Chinese Journal of Chemical Engineering. – 2012. – V.20(5) . – P. 995–1002.

# ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ ИЗОЛЯТОВ В ПРОЦЕССЕ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ВОДНОЙ ФАЗЫ ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО ОЖИЖЕНИЯ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА

С.В. Клементьев<sup>176</sup>, Ю.В. Куликова<sup>177</sup>, А.С. Сироткин<sup>178</sup>

На сегодняшний день один из крупномасштабных отходов биологических очистных сооружений – избыточный активный ил практически не подвергается утилизации. Более 90 % всей биомассы ила складывается на полигонах захоронения, что приводит к дополнительному отчуждению территорий и выбросу парниковых газов [1]. К наиболее перспективным способам утилизации избыточного активного ила следует отнести метод гидротермального ожигения его биомассы, заключающийся в трансформации исходных органических веществ в субкритических условиях ( $T = 200\text{--}400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 4\text{--}22\text{ МПа}$ ) [2]. В результате процесса ожигения исходного сырья образуется несколько фракций (фаз): нефтяная, твердая, водная. Основной проблемой реализации процесса гидротермального ожигения в промышленности является образование большого количества высококонцентрированных сточных вод (водной фазы), требующих очистки перед сбросом в водоемы. В литературе встречаются результаты по применению чистых бактериальных культур для обезвреживания компонентов водной фазы, полученной в результате гидротермального ожигения различного сырья [3].

Целью работы являлось получение микробных культур, способных к деструкции компонентов водной фазы и описание их физиолого-биохимических свойств.

Объектами исследования являлись активный ил ПАО «Нижекамскнефтехим», г. Нижнекамск, Республика Татарстан в качестве источника микроорганизмов-деструкторов; водная фаза, полученная в результате гидротермального ожигения биомассы избыточного активного ила коммунально-бытовых очистных сооружений г. Калининград (условия процесса ожигения:  $T = 260\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 4,5\text{ МПа}$ ,  $t = 20\text{ минут}$ ).

**Результаты и обсуждения.** Из активного ила ПАО «Нижекамскнефтехим» было получено 11 изолятов, способных к деструкции компонентов водной фазы. Для дальнейшего удобства культуры были пронумерованы от S1-S11. Морфологически культуры относятся к разным таксономическим группам.

<sup>176</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

<sup>177</sup> Балтийский федеральный университет, Калининград, Россия

<sup>178</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Клетки изолятов S1, S10, S11 являлись грамотрицательными палочками размером от 3,5 до 4 мкм, расположенные одиночно; S2 – крупные грамотрицательные извитые бактерии с закругленными концами размером от 5,3 до 6 мкм; изоляты S3, S5, S7 – грамположительные кокки, расположенные гроздьями с размером клеток от 1,86 до 2 мкм; клетки S4, S6 представляли собой грамположительные кокки диаметром ~ 2 мкм, расположенные одиночно; S8 – грамположительные палочки средней длиной от 3,5 до 4,1 мкм, расположенные попарно; S9 – крупные грамположительные палочки, длина которых составляет 8 мкм, с ровными концами [4].

В ходе периодического культивирования полученных изолятов в течение 48 часов на водной фазе процесса гидротермального ожигения избыточного активного ила общая эффективность биодеструкции органических веществ по химическому потреблению кислорода (ХПК) варьировала от 24 % (изолят S5) до 75 % (изолят S11). К наиболее перспективным из полученных изолятов были отнесены культуры S2, S7 и S11. Эти культуры обеспечивали лучший прирост биомассы по сравнению с другими изучаемыми штаммами, эффективнее обезвреживали компоненты водной фазы: эффективность их биодеструкции по ХПК составила 69, 73, 75 %, соответственно.

Следующий этап заключался в молекулярно-генетической идентификации перспективных изолятов. Идентификацию осуществляли с секвенированием последовательности гена 16S рНК с использованием универсальных праймеров 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5' GGYTACCTTGTTACGACTT 3').

На основании результатов секвенирования для изолятов S2, S7 и S11 были получены последовательности, состоящие из 1537, 1638 и 1724 нуклеотидов, соответственно.

Согласно нуклеотидной последовательности изолят S2 был идентифицирован как *Pseudomonas glycinae* MS586 (степень идентичности 99,52 %); штаммы S7 и S11 – как *Paenarthrobacter nicotinovorans* DSM 420 (99,8 %) и *Comamonas testosteroni* KS 0043 (99,6 %), соответственно.

### Заключение

Из активного ила ПАО «Нижекамскнефтехим» было выделено 11 изолятов, способных осуществлять деструкцию компонентов водной фазы, которые относятся к различным таксономическим группам по результатам дифференцированного окрашивания и исследования биохимических свойств.

В ходе молекулярно-генетической идентификации было показано, что изолят S2 определен как *Pseudomonas glycinae* MS586, S7 – *Paenarthrobacter nicotinovorans* DSM 420, S11 – *Comamonas testosteroni* KS 0043.

### Список литературы:

1. Zhou Y., Remon J., Pang X., Jiang Z., Liu H., Ding W. Hydrothermal conversion of biomass to fuels, chemicals and materials: A review holistically connecting product properties and marketable applications. *Sci. Total Environ.*, 2023, 86, 163920. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163920>;

2. Watson J., Wang T., Si B., Chen W., Aierzhati A., Zhang Y. Valorization of hydrothermal liquefaction aqueous phase: pathways towards commercial viability. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2020, 77, 100819. <https://doi.org/10.1016/j.peecs.2019.100819>;
3. He Y., Li X., Xue X., Swita M.S., Schmidt A.J., Yang B. Biological conversion of the aqueous wastes from hydrothermal liquefaction of algae and pine wood by Rhodococci. *Bioresour. Technol.*, 2017, 224, 457–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.059>;
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-24-00064.*

# РОЛЬ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ НАСЕКОМЫХ В ИЗМЕНЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХОЗЯИНА К ЭНТОМОПАТОГЕНАМ

Т. Н. Клементьева<sup>179</sup>, О. В. Поленогова<sup>180</sup>, Н.А. Крюкова<sup>181</sup>, В.В. Глупов<sup>182</sup>

Любые факторы биотической, абиотической или антропогенной природы способны привести к изменению структуры микробиоты насекомых. Такие изменения сопровождаются увеличением количества определенных групп бактерий, синтезом ими биологически активных веществ (вторичных метаболитов), являющихся антибиотиками, антимикотиками, гормонами и т.д. Подобные процессы направлены на предотвращение колонизации кишечника чужеродными микроорганизмами, деградацию и детоксикацию токсинов, растительных метаболитов и т.д. Данные изменения могут приводить к появлению резистентных к этим веществам форм микроорганизмов, имеющих конкурентное преимущество, что может сказываться на жизнедеятельности насекомых, влияя на физиологические процессы и восприимчивость насекомых к энтомопатогенам, в частности, бактериям *Bacillus thuringiensis*.

В данном исследовании моделировали процессы длительного стрессового воздействия вторичных метаболитов, обладающих антимикробными свойствами, на структуру микробного сообщества, активность пищеварительных и антиоксидантных систем, а также чувствительность насекомых к энтомопатогенным бактериям *B. thuringiensis*. В качестве вторичных метаболитов использовали антибиотик широкого спектра действия – амикацин, который вводили в диету лабораторной линии воцинной огнёвки *Galleria mellonella* L. на протяжении восемнадцати генераций.

Результаты метагеномного анализа кишечного микробного сообщества выявили кардинальные изменения структуры микробиоты у воцинной огневки F18, в диету которой добавляли антибиотик: смене доминирующих бактерий на уровне рода – увеличению ( $\times 73$ ) численности минорных *Enterococcus mundtii* и снижению ( $\times 90$ ) доминирующих *E. faecalis*. Эти изменения сопровождались увеличением активности протеолитических и детоксицирующих ферментов в среднем отделе кишечника личинок. Для изолированных из кишечника воцинной огневки на диете с антибиотиком *E. mundtii* и *E. innesii*, была выявлена устойчивость к антибиотику и отсутствие способности ин-

<sup>179</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>180</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>181</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>182</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

гибировать рост *B. thuringiensis*. Однако, при пероральном скармливании личинкам вощинной огневки F18 нативной линии *B. thuringiensis* совместно с симбионтами наблюдалось подавление развития бактериальной инфекции. Так, инокуляция *E. mundtii* повышала выживаемость личинок *G. mellonella* в 1,6 раз, а *E. innesii* – в 9 раз, по сравнению с инфицированием насекомых только *B. thuringiensis*.

Мы считаем, что увеличение численности *E. mundtii* в кишечном микробном сообществе *G. mellonella* выступают одним из механизмов адаптации насекомых к изменению экологических условий (к антибиотическим веществам). Подобные процессы происходят у всех животных, что может являться одним из ключевых механизмов в формировании устойчивости к вирулентным микроорганизмам, широко распространенным в природе. Результаты данного исследования открывают перспективы для исследований резистентных симбиотических микроорганизмов (в том числе, и к антибиотикам различного происхождения): их преимуществ для персистенции в динамичной среде кишечника различных животных, условий для изменения их стратегии и проявления вирулентных свойств.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда  
в рамках научного проекта № 22-76-10051.*

# РОЛЬ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ ЖЕЛЕЗА

Г.С. Ключин<sup>183, 184</sup>, С.Н. Гаврилов<sup>185</sup>

Электромикробиология является одним из самых молодых направлений микробиологии, сформировавшимся на рубеже XX и XXI веков. Однако более ста лет назад была впервые выдвинута гипотеза о том, что микроорганизмы можно использовать для генерации электрического тока. Ученый-ботаник М. Поттер в 1911 г. сконструировал первый в истории микробный топливный элемент (МТЭ) и использовал для получения электричества бродильщикиков – *S. cerevisiae* и *E. coli*. МТЭ М. Поттера мог вырабатывать только слабый по силе и напряжению ток, и при этом не был определен вклад микроорганизмов в его генерацию из-за присутствия в среде дрожжевого экстракта и медиаторов. Следующий подход, который активно применялся в 60-80-е гг. XX в. заключался в целенаправленном применении наряду с микроорганизмами искусственных медиаторов для повышения мощности тока. Но и в этих случаях электрический ток всегда оказывался крайне слабым, а жизнедеятельность микроорганизмов в МТЭ часто подавлялась. Настоящий перелом в становлении электромикробиологии произошел только тогда, когда микробиологи установили взаимосвязь между процессами микробного электрогенеза и микробного окисления/восстановления железа. Поскольку железо обладает очень низкой растворимостью в нейтральных и щелочных условиях и выяснилось, что микробное восстановление твердофазного железа связано с переносом на его поверхность электронов от клеток микроорганизмов (внеклеточный перенос электронов – ВПЭ), было высказано предположение о том, что именно железоредукторы наиболее активно по сравнению с другими микроорганизмами способны передавать электроны на анод. В 1990-х годах МТЭ с железоредукторами родов *Shewanella* и *Geobacter* показали выработку намного более сильных по мощности и плотности электрических токов. Таким образом, с конца 1990-х годов установлена взаимосвязь между электромикробиологией и микробным минералообразованием, и по настоящее время для микробного электрогенеза используется только прокариоты, обладающие внеклеточным переносом электронов.

<sup>183</sup> Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

<sup>184</sup> E-mail: Klyushin1999@list.ru

<sup>185</sup> Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

Результатом открытия в микробиологии процесса внеклеточного переноса электронов стало формирование особой группы микроорганизмов, способных активно взаимодействовать с электродами, которых стали называть электроактивными. Наиболее активными среди всех таких микроорганизмов были прокариоты. Бактерии и археи, способные к активной передаче электронов при окислении субстратов на анод и тем самым обеспечивающие генерацию в МТЭ электрических токов, получили название электрогены. Прокариоты, потребляющие электроны с катода для обеспечения собственного дыхания и метаболизма, стали называться электротрофами.

За почти 30-летний период исследований в области электромикробиологии было обнаружено, что электроактивность распространена в той или иной степени у многих прокариот. Однако по-настоящему сильных электрогенов и электротрофов немного. С позиции генерации биоэлектрохимическими системами наиболее мощных электрических токов исследователей привлекают именно электрогены. До сих пор наиболее сильными электрогенами являются модельные виды – *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens*, *Shewanella oneidensis* и *Shewanella putrefaciens*. Также штаммы некоторых бактерий способны вырабатывать в МТЭ равный по мощности с модельными видами электрический ток – например, *Escherichia coli* (DH5α), *Rhodospseudomonas palustris* (DX1). Но все больше появляется сообщений о генерации сильных по мощности среди экстремофильных прокариот электрических токов, не уступающих и даже порой превосходящих ток модельных видов. Высокие по мощности электрические токи вырабатываются такими экстремофилами как “*Thermincola potens*”, *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Calditerrivibrio nitroreducens* и др. Особенности метаболизма и наличие более эффективных механизмов ВПЭ обуславливают в настоящее время активный тренд на поиск наиболее сильных электрогенов среди именно экстремофилов. Таким образом, в настоящее время до сих пор актуален поиск наиболее сильного электрогена.

Электроактивные микроорганизмы играют большую роль в отдельных экосистемах. Велика их роль в функционировании микробиомов кишечника, процессах биокоррозии и прямого межвидового переноса электронов, однако наиболее выдающийся их вклад с глубокой древности связан с минералообразованием. Однако до сих пор крайне мало работ, посвященных роли электроактивных микроорганизмов в минералообразовании.

В нашем исследовании по изучению электроактивных экстремофильных прокариот были поставлены следующие задачи: 1) Исследование электрокаталитических свойств экстремофильных микробных сообществ осадочных местообитаний; 2) Выделение и описание новых электрогенных экстремофильных микроорганизмов; 3) Изучение электрокаталитических свойств новых электрогенных экстремофильных микроорганизмов; 4) Исследование электрокаталитических свойств имеющихся в коллекции культур (термофилов); 5) Исследование распространенности электрокаталитических свойств среди экстремофильных микроорганизмов, участвующих в биоминерализации.

За время экспериментальных работ нами был собран и испытан осадочный МТЭ, который представлял собой систему, подобную колонке Виноградского, так как характеризовался вертикальным градиентом значений окислительно-восстановительного потенциала. Важнейшей составляющей осадочного МТЭ была расположенная в нижней его части (анаэробной зоне) нефтезагрязненная почва – основной источник микроорганизмов. Осадочный МТЭ благодаря микробному сообществу нефтезагрязненной почвы вырабатывал ток силой 0,7 мА, а методом высокопроизводительного секвенирования на платформе illumina по гену 16S рРНК удалось установить, что за 39 недель его непрерывной работы на аноде и катоде стали доминировать электроактивные микроорганизмы. Электрогены анода были представлены бактериями родов *Geobacter*, *Thermincola*, *Geobacteraceae*, *Citrifermentans*, *Syntrophus*, *Desulfovibrio* и *Corriobacteriia*, которые в сумме составляли почти 45% бактериального сообщества. На катоде за время работы осадочного МТЭ сложились весьма селективные условия, которые привели к доминированию единственного электротрофа из рода *Pseudomonas*, доля которого в сообществе превысила 50%.

Данный осадочный МТЭ стал источником для выделения экстремофильных электрогенов. Так нами была выделена чистая культура термофильного потенциального электрогена рода *Thermincola* из образца анода. Потенциальная способность быть электрогеном у выделенной чистой культуры была проверена нами по способности восстанавливать синтезированный ферригидрит. Оказалось, что чистая культура рода *Thermincola* действительно оказалась способной восстанавливать ферригидрит до магнетита, что указывает на ее способность к внеклеточному транспорту электронов.

Также нами были получены накопительные культуры мезофильных железоредукторов из образцов анода указанного выше осадочного МТЭ, а также накопительные культуры термофильного нитратредуктора рода *Calditerrivibrio* из пробы горячего источника кальдеры Узон, для которого было показано накопление на анодах другого осадочного МТЭ в горячем источнике кальдеры Узон. Помимо этого была получена накопительная культура психрофильного железоредуктора из морского осадочного МТЭ.

В дальнейшем все полученные в ходе экспериментов накопительные культуры планируются довести до чистых культур и проверить их электрокаталитические свойства, как потенциальных электрогенов, при испытании в отдельных МТЭ.

*Работа поддержана грантом РФФ 24-64-00023.*

# ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* STG-344 ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОДУКЦИИ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ф.С. Коблов<sup>186, 187</sup>, А.А. Ермолюк<sup>188</sup>, Д.А. Авданина<sup>189</sup>, С.Г. Калинин<sup>190</sup>,  
Б.Ф. Васильева<sup>191</sup>, М.В. Демьянкова<sup>192</sup>, О.В. Ефременова<sup>193</sup>, А.А. Жгун<sup>194</sup>

Разработка в середине XX века методики для глубинного культивирования плесневых грибов рода *Penicillium* с целью получения антибиотиков пенициллинового класса стала одним из важнейших событий в истории медицины, позволившее значительно сократить смертность от ранее неизлечимых болезней и улучшить качество жизни людей по всему миру [1]. В течение последующих двадцати лет разрабатывались новые антибиотические препараты, оптимизировались методы их промышленного производства, что охарактеризовало данный период как «Золотую эру антибиотиков». Тем не менее, окончание этой эпохи было закономерным и связано с появлением резистентных штаммов микроорганизмов, значительно сократившим эффективность лечения старыми препаратами. Учитывая значимость антибиотиков в современной медицине и сокращение числа новых препаратов в практике наряду с проблемой резистентности, вопрос о поиске новых противомикробных соединений является одним из важнейших в современной науке. В настоящее время метод глубинного культивирования остается по-прежнему важнейшим способом производства антибиотиков. Данный процесс обладает рядом преимуществ: он легко поддается автоматизации, механизации и масштабированию, в нем легче поддерживать стерильные условия.

В нашей работе провели оптимизацию культивирования штамма *Penicillium chrysogenum* STG-344, ранее изолированного с древнерусской иконы 16-го века в Государственной Третьяковской галерее. В предыдущей работе изучили антимикробную

<sup>186</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии, Москва, Россия

<sup>187</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>188</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии, Москва, Россия

<sup>189</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии, Москва, Россия

<sup>190</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии, Москва, Россия

<sup>191</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>192</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>193</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>194</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт Биоинженерии, Москва, Россия

активность этого штамма против репрезентативной панели тест-культур микроорганизмов на агаризованной среде Чапека-Докса. Показали, что *P. chrysogenum* STG-344 обладает высокой активностью против различных микроорганизмов, в том числе против *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *S. aureus* FDA 209P (MSSA), *Mycobacterium smegmatis* ВКПМ Ас-1339, *M. smegmatis* мс<sup>2</sup> 155. В связи с этим было решено продолжить работу с этим перспективным штаммом и оптимизировать процесс глубинного культивирования для высокоурожайной продукции антимикробных метаболитов. В нашей работе изучили активность *P. chrysogenum* STG-344 на трех питательных средах: i) Чапека-Докса (CD, г/л: сахароза – 30; NaNO<sub>3</sub> – 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01); ii) CDF (стандартный состав среды CD с добавлением соевой муки 1 г/л); iii) среда Гаузе №2 (GII) (г/л: пептон – 5, триптон – 3, глюкоза – 10, NaCl – 5).

Таблица 1.

Диаметр зон ингибирования роста тест-культур КЖ штамма *P. chrysogenum* STG-344, после культивирования в течение 1 недели

Среда	Зона ингибирования тест-культуры, мм															
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus mycoides</i> 537	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P (MSSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> K-12	<i>Escherichia coli</i> ИНА 01355	<i>Escherichia coli</i> ИНА 01356	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Aspergillus niger</i> ИНА 00760	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ВКПМ Ас-1339	<i>Mycobacterium smegmatis</i> мс <sup>2</sup> 155
CD	16	22	17	22	20	21	0	0	0	13	15	0	0	0	29	29
CDF	18	20	17	21	19	17	0	0	0	16	15	0	0	0	16	24
GII	20	0	0	24	15	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0

Данные об ингибировании микробного роста получали после инокуляции на подложки с тест-культурами аликвот культуральной жидкости (КЖ) штамма STG-344, культивируемого на жидких питательных средах в течение недели (Таблица 1). Оказалось, что наибольшая активность проявляется при культивировании на вариантах среды CD, без и с добавлением соевой муки. Однако при добавлении соевой муки культура была более гомогенная. Поэтому для изучения активности при дальнейшем культивировании выбрали именно среду CDF.

Таблица 2.

Диаметр зон ингибирования роста тест-культур КЖ штамма *P. chrysogenum* STG-344, при культивирования на среде CDF в течение 3-х недель

Штамм	Неделя	Зона ингибирования тест-культуры, мм															
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus mycoides</i> 537	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P (MSSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> К-12	<i>Escherichia coli</i> ИНА 01355	<i>Escherichia coli</i> ИНА 01356	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Aspergillus niger</i> ИНА 00760	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ВКПМ Ас-1339	<i>Mycobacterium smegmatis</i> мс <sup>2</sup> 155
STG-344	1	18	20	17	21	19	17	0	0	0	16	15	0	0	0	16	24
	2	27	35	30	31	23	30	0	28	33	30	31	22	29	28	35	28
	3	30	35	0	29	22	23	14	26	28	29	28	16	22	18	30	26

После двух недель культивирования выявили расширение спектра и усиление антимикробной активности (Таблица 2). Спустя 3 недели – спектр угнетения еще расширился, КЖ оказалась активной также против *Leuconostoc mesenteroides*.

Можно сделать вывод, что условия культивирования штамма *P. chrysogenum* STG-344 значительно влияют на продукцию противомикробных препаратов, наилучшей средой оказалась жидкая среда CDF. Широкий спектр активности против бактерий и грибов может свидетельствовать о том, что штамм продуцирует коктейль антимикробных соединений. В пользу этого также говорит различная временная чувствительность тест-культур, одни наиболее чувствительны к КЖ после 2-х недель, другие – после 3-х недель. Дальнейшие исследования связаны с разработкой методики для препаративной наработки высокоактивных метаболитов у STG-344, с целью определения индивидуальных структур.

### Список литературы:

1. Zhgun A.A. Industrial Production of Antibiotics in Fungi: Current State, Deciphering the Molecular Basis of Classical Strain Improvement and Increasing the Production of High-Yielding Strains by the Addition of Low-Molecular Weight Inducers // Fermentation. 2023. Vol. 9, № 12. P. 1027.

# ГРИБНЫЕ ПАТОГЕНЫ ЦИКОРИЯ: ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К ФУНГИЦИДАМ

А.М. Козырева<sup>195</sup>, С.Н. Еланский<sup>196</sup>, Л.Ю. Кокаева<sup>197</sup>

Цикорий корнеплодный (*Cichorium intybus* L.) является ценной культурой, которую выращивают для получения заменителя кофе, не содержащего кофеин, а также инулина и фруктозы. Цикорий обладает лекарственными свойствами, например, содержит пребиотик инулин, помогает при болезнях печени (Вьютнова, Новикова, 2018). Существуют данные о том, что цикорий способствует замедлению онкологических процессов (Patkowska, Konopinski, 2013). Проблема состоит в том, что при выращивании цикорий поражают фитопатогенные микроорганизмы, которые в эпифитотийные годы могут повредить до половины урожая корнеплодов (Смирнова и др, 2022). На данный момент в России не зарегистрированы препараты для защиты цикория (гос. каталог пестицидов).

Целью нашей работы было описание видового состава, патогенности и восприимчивости к фунгицидам штаммов грибов, выделенных из пораженных корнеплодов цикория. Исследование проводилось на цикории, выращенном в средней полосе России (Ярославская и Костромская области).

С помощью секвенирования участка ядерных рибосомных генов (ITS1-5,8S-ITS2), генов кальмодулина и бета-тубулина удалось выявить 11 видов грибов: *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, *Botrytis cinerea* Pers., *Chlamydocillium cyanophilum* Zare & W. Gams, *Paraphoma chrysanthemicola* (Hollós) Gruyter, Aveskamp & Verkley, *Penicillium expansum* Link, *Penicillium solitum* Westling, *Penicillium cf tulipae* Overy & Frisvad, *Penicillium verrucosum* Dierckx, *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams, *Sclerotinia nivalis* I. Saito, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Оценку патогенности выделенных штаммов проводили *in vitro*: в чашки Петри помещали ломтики здоровых корнеплодов цикория, на центр ломтика клали агаровый блок с мицелием гриба. Аналогичное тестирование проводили на клубнях топинамбура, который, как и цикорий, относится к семейству сложноцветных и накапливает в подземных органах полисахарид инулин. Тесты показали, что наиболее патогенны для цикория и топинамбура виды *Boeremia exigua*, *Sclerotinia sclerotiorum*, а также пенициллы (*Penicillium expansum*, *Penicillium cf tulipae*, *Penicillium verrucosum*). *Botrytis cinerea*, *Penicillium*

<sup>195</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>196</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>197</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*solitum*, *Plectosphaerella cucumerina* и *Sclerotinia nivalis* также поражали корнеплоды, однако развитие заболевания шло значительно медленнее. *Chlamydosporium cyanophilum* и *Paraphoma chrysanthemicola* не поражали ломтики корнеплодов ни у цикория, ни у топинамбура. Согласно литературным данным, *C. cyanophilum* является сапротрофом в почве (Zare, Gams, 2016), а *P. chrysanthemicola* может быть эндофитом (Sun et al., 2023). Интересно, что фитопатогенные грибы, выделенные из цикория, более активно поражали ломтики топинамбура, чем ломтики цикория.

Для того, чтобы оценить чувствительность грибов к фунгицидам, их выращивали в чашках Петри с питательной средой КГА, имеющей разную концентрацию фунгицидов (0.1, 1, 10 и 100 мг/л). Для эксперимента были выбраны фунгициды боскалид (препарат Кантус), флудиоксонил (препарат Максим) и дифеноконазол (препарат Скор). Мы использовали данные фунгициды, так как в некоторых странах, например, во Франции, они зарегистрированы для защиты цикория (каталог средств защиты растений, удобрений и питательных сред, разрешенных во Франции). Эти фунгициды имеют различный механизм действия. Так, боскалид ингибирует фермент сукцинатдегидрогеназу, участвующую в процессе клеточного дыхания (Stammler et al., 2008). Флудиоксонил нарушает сигнальный путь, ответственный за адаптацию к осмотическому стрессу, что приводит к нарушению осмотического давления в клетке фитопатогена (Bersching, Jacob, 2021). Дифеноконазол ингибирует синтез эргостерола – важного компонента клеточной мембраны грибов (Dong et al., 2013). В качестве контроля использовалась среда КГА без фунгицида. Для того, чтобы оценить эффективность фунгицидов, рассчитывались значения ЕС50 (концентрация фунгицида, уменьшающая диаметр колонии гриба на 50% относительно бесфунгицидного контроля). Мы исследовали влияние фунгицидов на фитопатогенные штаммы *Boeremia exigua*, *Sclerotinia nivalis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Plectosphaerella cucumerina*.

Эксперимент показал, что большинство этих грибов чувствительны к действию боскалида, флудиоксонила и дифеноконазола (ЕС50 < 1 мг/л). Однако, были обнаружены устойчивые штаммы. Так, *Penicillium expansum* и *Plectosphaerella cucumerina* были устойчивы к действию боскалида (ЕС50 > 100 мг/л). Также мы наблюдали пониженную чувствительность к боскалиду у *Botrytis cinerea* (ЕС50 = 6.6 мг/л), к флудиоксонилу у *Plectosphaerella cucumerina* (ЕС50 = 8.8 мг/л). В отличие от боскалида и флудиоксонила, дифеноконазол эффективно подавлял рост всех штаммов грибов. Для эффективной защиты цикория от грибных болезней необходимо продолжить изучать биоразнообразие патогенов, а также тестировать их восприимчивость к различным препаратам.

### Список литературы:

1. Вьютнова О. М., Новикова И. А. Хозяйственное значение и целебные свойства культуры цикория // Овощи России. – 2018. – №. 5. – С. 65–66.
2. Смирнова И. В., Вьютнова О. М., Максимова К. С. Агрохимические приемы повышения устойчивости корнеплодов цикория корневого к корневым гнилям // Известия федерального научного центра овощеводства. – 2022. – № 3-4. – С. 82.

3. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации (дата обращения 05.09.24).
4. Каталог средств защиты растений, удобрений и питательных сред, разрешенных во Франции <https://ephy.anses.fr/> (дата обращения 04.02.24).
5. Bersching K., Jacob S. The molecular mechanism of fludioxonil action is different to osmotic stress sensing //Journal of Fungi. – 2021. – Т. 7. – №. 5. – С. 393.
6. Dong F., Li J., Chankvetadze B., Cheng Y., Xu J., Liu X., Li Y., Chen X., Bertucci C., Tedesco D., Zanasi R., Zheng Y. Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil //Environmental Science & Technology. – 2013. – Т. 47. – №. 7. – С. 3386–3394.
7. Patkowska E., Konopinski M. Harmfulness of soil-borne fungi towards root chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* Bisch.) cultivated with the use of cover crops //Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus. – 2013. – Т. 12. – №. 4. – С. 3–18.
8. Stammler G., Brix H.D., Nave B., Gold R., Schoefl U. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action //Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany. – 2008. – С. 45–51.
9. Sun W., Feng M., Zhu N., Leng F., Yang M., Wang Y. Genomic characteristics and comparative genomics analysis of the endophytic fungus *Paraphoma chrysanthemicola* DS-84 isolated from *Codonopsis pilosula* root //Journal of Fungi. – 2023. – Т. 9. – №. 10. – С. 1022.
10. Zare R., Gams W. More white Verticillium-like anamorphs with erect conidiophores //Mycological Progress. – 2016. – Т. 15. – №. 10-11. – С. 993–1030.

# ПОЧВЕННЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ДИОКСИНАМИ НА ТЕРРИТОРИИ, ПРИЛЕГАЮЩЕЙ К ПОЛИГОНУ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ «САЛАРЬЕВО»

А.В. Кондратьева-Гринь<sup>198</sup>, Л.А. Поздняков<sup>199</sup>,  
А.Р. Лавренов<sup>200</sup>, В.С. Румак<sup>201, 202</sup>

Диоксины относятся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ) – опасных химических веществ, вызывающих особое беспокойство высоким токсическим потенциалом. Попадая в организм человека, диоксины накапливаются в нем благодаря своей химической устойчивости и способности образовывать комплексы с жировыми тканями, в которых они откладываются. Активными источниками выбросов диоксинов являются созданные по устаревшим технологиям полигоны твердых отходов производства и потребления (ТКО). На территориях больших и малых городов России такие полигоны встречаются повсеместно.

Стабильность диоксинов и практически непрерывное их поступление из полигонов ТКО в окружающую среду вместе с выбросами способствуют неопределенно долгому опосредованному средой действию в малых дозах на обитателей, биоаккумуляции в трофических цепях и кумуляции в тканях живых организмов в токсичных для них количествах (Лавренов, 2023). Микроорганизмы могут увеличивать биодоступность диоксинов путем количественного и качественного изменения их мембраны, что способствует усилению их поглощения (Mahfouz, 2020). С другой стороны, микроорганизмы могут быть эффективными в биодеградации диоксинов, что может быть полезно для разработки биотехнологических подходов к очистке от диоксинов окружающей среды (Hiraishi, 2003).

В качестве объекта исследования был выбран рекультивируемый в настоящее время полигон ТКО Саларьево, до 2013 года он являлся самым большим полигоном такого рода в Европе. На прилегающей к полигону территории было заложено два почвен-

<sup>198</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения

<sup>199</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения

<sup>200</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>201</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>202</sup> Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН

ных разреза – S1 (55.611520, 37.418358 – в непосредственной близости от полигона) и S2 (55.615724, 37.402720 – в парке «Филатов луг»); были вскрыты дерново-подзолистые слабо оглеенные почвы. Помимо этих разрезов также был заложен условный контроль на территории Троицкого лесного массива (разрез S3 с координатами 55.417925, 37.289854). Как показали дальнейшие исследования, все три почвы являются идентичными по основным почвенно-генетическим и микробиологическим показателям, поэтому могут быть сравнимы друг с другом.

Ранее в рамках исследования Румака В.С., Умнова Н.В., Левенкова Е.С. и др. (2017) определяли уровень содержания диоксинов в окрестностях полигона «Саларьево» – в том числе отбирались пробы из поверхностного слоя почв. Концентрация ТХДД в почвах достигала 4,8 пг/г, WHO-TEQ98 - коэффициент эквивалентной токсичности – 14,5. Разрезы S1 и S2 были заложены на месте исследованных в рамках этой работы точек.

Методы люминесцентной микроскопии и газовой хроматографии показали, что загрязнение исследованных почв диоксинами значимо не изменило общую численность, биомассу и дыхательную активность почвенных микробных сообществ относительно выбранного условного контроля, однако вызвало некоторые изменения в интенсивности процессов цикла азота и таксономической структуре бактериальных сообществ. Так, активность азотфиксации в загрязненных почвах снижается, а интенсивность образования  $N_2O$  и потенциальная активность денитрификации возрастает, особенно в верхнем горизонте. Одновременно в загрязненных почвах в значимых количествах появляются представители филума *Nitrospiriota*.

Использование высокопроизводительного секвенирования генов 16s рРНК Illumina показало, что присутствие диоксинов в почвах приводит к заметным изменениям таксономического состава. В отличие от контрольной почвы, имеющей однородный состав бактериальных сообществ по всему профилю, загрязненные почвы характеризуются нестабильной таксономической структурой сообществ, что может быть вызвано перераспределением диоксинов между почвенными горизонтами и различным откликом микроорганизмов на меняющийся уровень загрязнения. Наибольшую реакцию проявляют представители филумов *Nitrospiriota*, *Pseudomonadota*, *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*.

При помощи метода Real-Time PCR было изучено количество копий генов, отвечающих за осуществление первых и последних стадий разложения диоксинов. Использовались праймеры, подобранные с помощью программы UGENE к некоторым генам, которые по литературным данным могут участвовать в разложении диоксинов. Все эти гены принадлежат к диоксиновому локусу *Sphingomonas* sp. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/X72850.1>).

Количество копий большинства генов возрастает в нижних горизонтах загрязненных почв – ЕВ и В, особенно это характерно для точки S2, значительно более загрязненной по данным Румака В.С. и др. (2017). Известно, что диоксины мигрируют в нижние горизонты почвенного профиля с осадками, аккумулируются в суглинистых и глини-

стых горизонтах и сохраняются в почве в течение длительного времени благодаря своей структурной стабильности и гидрофобности.

При этом во всех исследованных почвах и горизонтах, в том числе и в незагрязненном контроле, было обнаружено большое количество копий генов, отвечающих за первые стадии разложения диоксинов. По всей видимости, они могут участвовать в процессах разложения других соединений естественного происхождения, в частности, почвенного органического вещества. В верхних гумусированных горизонтах А и АЕ поступление диоксинов может даже снижать как количество копий этих генов, так и их соотношение с количеством копий бактериальных генов 16s рРНК. Однако в нижних горизонтах эти показатели кратно увеличиваются в соответствии с уровнем загрязнения почв для генов, отвечающих за последние стадии разложения диоксинов – dxnG, dxnH, dxnI.

### Список литературы:

1. Особенности экспрессии маркерных генов рыжей полевки *Clethrionomys glareolus*, отражающие эффекты экотоксичности загрязненной диоксинами среды / А.Р. Лавренов, Т.А. Мышлявкина, Н.В. Умнова, А.И. Ким, В.С. Румак // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2023. – Т. 78, № 2. – С. 86–94. – DOI 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-6. – EDN EADGQF.
2. Mahfouz, S., Mansour, G., Murphy, D.J. Hanano, A. Dioxin impacts on lipid metabolism of soil microbes: towards effective detection and bioassessment strategies. *Bioresour. Bioprocess.* 7, 59 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40643020003471>
3. Akira Hiraishi. Biodiversity of DioxinDegrading Microorganisms and Potential Utilization in Bioremediation. *Microbes and Environments* 18(3):105125, October 2003. DOI:10.1264/jsme2.18.105
4. Румак В.С., Умнова Н.В., Левенкова Е. С., Турбабина К.А., Пивоваров Е.А., Шелепчиков А.А., Павлов С.Д. Диоксины в среде и организме животных вблизи полигона отходов производства и потребления: к методологии оценки риска для здоровья населения // *Экология человека* 2017.1 *Окружающая среда.* 2017
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X72850.1>

# ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ТЕРМОКАРСТОВЫХ ОЗЕР ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

А.И. Косякова<sup>203</sup>, О.С. Самылина<sup>204</sup>, О.И. Габышева<sup>205</sup>,  
В.А. Габышев<sup>206</sup>, В.В. Кадников<sup>207</sup>, А.В. Белецкий<sup>208</sup>, Н.В. Пименов<sup>209</sup>

В условиях глобального потепления климата одним из проявлений деградации вечной мерзлоты является активация термокарстовых процессов, приводящая к появлению просадочных форм рельефа и образованию термокарстовых озёр. Пологосклонные и плоскодонные термокарстовые котловины Центральной Якутии называются аласами. Аласные озёра этого региона довольно разнообразны по своим морфометрическим и гидрохимическим характеристикам, но в большей степени представлены небольшими мелководными водоёмами с повышенной общей минерализацией и щёлочностью.

Климатическое значение аласных систем Центральной Якутии обусловлено высокими скоростями эмиссии метана с их территорий, причём, именно водоёмы характеризуются максимальными выбросами. Высвобождение метана происходит как из тающих газонасыщенных многолетнемёрзлых пород, так и в результате дисбаланса между микробными процессами метаногенеза и метаноокисления при разложении поступающего в водоём захороненного и современного органического вещества.

Несмотря на колоссальную климатическую и хозяйственную значимость аласных озёр Центральной Якутии работы по изучению микробных сообществ в них в настоящее время практически отсутствуют. Поэтому целью данной работы стал первичный анализ филогенетического разнообразия микробных сообществ трёх аласных озёр Центральной Якутии – Тюнгюлю, Табы и Харыялах. Оз. Тюнгюлю было выбрано для исследования, поскольку является известным объектом изучения эмиссии парниковых газов  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$ . Два других озера были выбраны случайным образом.

По результатам гидрохимических анализов, Табы и Тюнгюлю были отнесены к мезощелочным (рН 9.07 и 9.68 соответственно) мезогалинным (минерализация 1.72 и 3.15 г/л)

<sup>203</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>204</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>205</sup> Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН», Якутск, Россия

<sup>206</sup> Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН», Якутск, Россия

<sup>207</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>208</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>209</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

озерам натриево-хлоридного типа. Харыялах является олигоценным (рН 8.63) умереннопресным (минерализация 0.38 г/л) озером гидрокарбонатного-кальциевого типа. По содержанию минерального азота оз. Тюнгюлю и Табы являются гипертрофными водоемами, а оз. Харыялах –  $\beta$ -евтрофным. По концентрации фосфора все водоемы относятся к гипертрофным. Содержание метана в воде варьировало от 0.9 мкмоль/л (оз. Тюнгюлю) до 39 мкмоль/л (оз. Харыялах), а в различных горизонтах осадков достигало значений 101-105 мкмоль/л (оз. Тюнгюлю и Харыялах) и 490 мкмоль/л (оз. Табы).

Анализ разнообразия фрагментов гена 16S рРНК в образцах воды исследуемых озёр показал, что в планктонных сообществах доминировали бактерии, в то время как археи составляли минорную часть. Диаграмма Венна показала значительные различия в составе сообществ: только 2.2% ОТЕ были общими в трех озёрах (Рис. 1).

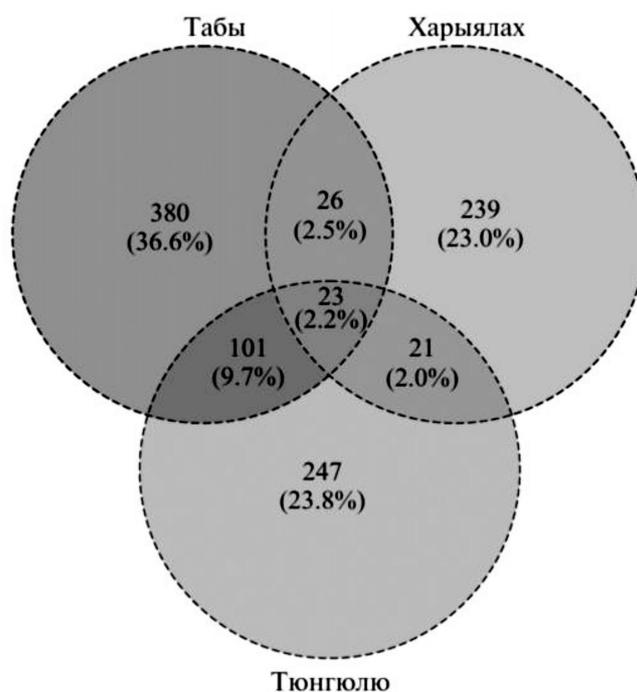


Рис. 1. Количество общих и уникальных ОТЕ в образцах воды трех аласных озёр Центральной Якутии (диаграмма Венна)

В планктонных сообществах оз. Тюнгюлю преобладали гетеротрофные бактерии класса *Gamma*proteobacteria (22.2%) и фил *Verrucocomicrobiota* (16.4%) и *Bacteroidota* (21.5%). Не было выявлено явных доминантов среди ОТЕ: из 392 ОТЕ всего 25 имели относительную численность более 1 и до 5%, при этом большинство из выявленных последовательностей ОТЕ не могли быть надёжно идентифицированы, поскольку имели ближайших родственников среди некультивируемых представителей на уровне семейств и более высоких таксонов.

В образце воды из оз. Табы половину от всех ОТЕ составляли бактерии филума *Bdellovibrionota* (54%) близкие к некультивируемому патогену дафний “*Spirobacillus*

*cienkowskii*”. Вторыми по численности были представители класса *Gamma proteobacteria* сем. *Comamonadaceae* (26.2%), родственные представителям сложнокультивируемого рода *Limnohabitans* (утилизируют легкоокисляемую органику) и двум близким родам *Hydrogenophaga* (утилизируют  $H_2$ ) и *Malikia* (накапливают полигидроксиалканоаты и полифосфаты).

В образце воды из оз. Харыялах доминировали представители филума *Actinobacteriota* (36.1%), среди которых наибольшую представленность имели последовательности, идентифицированные как CL500-29\_marine\_group (16.4%, сем. *Ilumatobacteraceae*, некультивируемые аэробные гетеротрофы с неясной экологией и физиологией) и клада hgcI (10.8%, сем. *Sporichthyaceae*, некультивируемые гетеротрофы с генетическим потенциалом использовать солнечный свет через актинородопсин). В составе второго по численности класса *Alphaproteobacteria* (18.5%) преобладали аэробные хемоорганогетеротрофные пресноводные бактерии ‘*Candidatus Fonsibacter ubiquis*’ (13.5%), потенциально способные к аэробному выделению метана через C-P-лиазный путь (разложение метилфосфонатов). Среди третьего по представленности филума *Verrucomicrobiota* (16.8%) доминировали последовательности, идентифицированные только до уровня семейства *Chthoniobacteraceae* (11.4%). Озеро Харыялах было единственным из трех изученных, где была выявлена высокая представленность филума *Cyanobacteriota* (9.8%), среди которых преобладали одноклеточные – неидентифицированные представители семейства *Prochlorococcaceae* и рода *Microcystis* (сем. *Microcystaceae*).

Микроорганизмы цикла метана в воде были немногочисленны. Метанотрофные бактерии отмечены только в воде оз. Харыялах и принадлежали исключительно к порядку *Methylococcales* (0.26%): сем. *Methylomonadaceae* (род не идентифицирован) и сем. *Methylococcaceae* (род *Methyloparacoccus*). В воде оз. Табы с самым низким содержанием растворённого кислорода выявлены метаногенные археи из семейств *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae* и *Methanosaetaceae* (суммарно 0.33%).

Таким образом, планктонные микробные сообщества аласных озёр Центральной Якутии разнообразны и изобилуют некультивируемым преимущественно хемогетеротрофным микроорганизмам с неясными функциями.

### Список литературы:

1. Самылина О.С., Габышева О.И., Габышев В.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Косякова А. И., Каллистова А. Ю., Пименов Н.В. Планктонные микробные сообщества термокарстовых озёр Центральной Якутии демонстрируют высокое разнообразие некультивируемых прокариот с неохарактеризованными функциями. Микробиология. 2024. Т. 93. № 2. С. 101–108. DOI: 10.31857/S0026365624020013

Работа выполнена при поддержке проекта РНФ № 22-14-00038.

# ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РОЛИ БЕЛКОВ gp84, gp61 И gp47 В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ БАКТЕРИОФАГА Ф24В

А.С. Кузнецов<sup>210</sup>, А.В. Моисеенко<sup>211</sup>,  
Д.С. Матюшкина<sup>212</sup>, А.В. Летаров<sup>213, 214, 215</sup>

В рамках фаговой конверсии многие бактериофаги способны направленно изменять фенотип зараженной бактериальной клетки. Этот процесс нередко связан с приобретением бактериями факторов патогенности. Одним из ярких примеров фаговой конверсии является образование шигатоксигенных *Escherichia coli* (STEC). Шигаподобный токсин *E. coli* является продуктом фаговых генов *stxA* и *stxB*, поэтому наличие Stx-профага определяет токсигенность соответствующих изолятов. В геномах STEC встречаются различные варианты Stx-профагов, среди которых распространен профаг ф24В или родственные ему провирусные геномные последовательности. Для понимания условий формирования STEC распространения этих штаммов необходимо установление механизма адсорбции ф24В-подобных фагов, а также факторов, влияющих на инфекционность Stx-конвертирующих вирусов.

Мы предполагаем, что конечный рецептор умеренного бактериофага ф24В, определенный как BamA, консервативный белок *E. coli*, распознается белком осевой фибриллы gp56 этого фага, в то время как белок боковых фибрилл gp61 способствует проникновению фаговой частицы через слой О-антигена, полисахаридной части ЛПС. Помимо белков gp56 и gp61 влияние на инфекционность вируса могут оказывать белки gp47 и gp84.

Биоинформатический анализ гена 56 и предсказание структуры тримера белка gp56 при помощи алгоритма AlphaFold говорят о наличии коллагеновых повторов в средней части этого белка. Учитывая данную модель, можно предположить, что благодаря низкоструктурированным коллагеновым повторам боковые фибриллы фага ф24В имеют большую длину и гибкость, закрепляются к хвосту N-концевым доменом, в то время

<sup>210</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>211</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>212</sup> Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>213</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>214</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>215</sup> Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

как С-концевой домен распознает пока не установленный рецептор. Также мы получили рекомбинантный бактериофаг  $\lambda_{2B8}$   $\lambda$ , вирионы которого практически идентичны частицам хорошо изученного фага  $\lambda$ , но С-конец боковых фибрилл совпадает с С-концом белка gr61 фага ф24В. Для фага  $\lambda_{2B8}$   $\lambda$  получены электронные микрофотографии. Мы полагаем, что, помимо связывания с неидентифицированным рецептором, белок gr61 может координировать сборку фагового хвоста в процессе морфогенеза вирусных частиц, поскольку мутантные лизогены, обладающие делецией в гене *b1* профага ф24В, при индукции профага практически не образовывали инфекционного вирусного потомства, хотя мы обнаружили вирусоподобные частицы при помощи ПЭМ.

Полученные аналогичным образом мутанты фага по генам *47* и *84* также оказались неинфекционными, в частности, мутанты по гену *47* имеют более округлые капсиды/прокапсиды и не до конца собравшийся хвост. Эти данные могут говорить о важном вкладе белков gr47 и gr84 в процесс морфогенеза частиц ф24В. Предположительно, белок gr47, являющийся самым крупным полипептидом этого фага, в ходе инфекционного процесса может участвовать в образовании транспериплазматического канала, который необходим подовирусам для эжекции фаговой ДНК в цитоплазму клетки.

Протеомный анализ диализованных суспензий фага ф24В показал, что белок gr84 при длительном хранении подвергается протеолизу. Инкубация свежеприготовленного препарата фага со свиным кишечным муцином приводила к повышению биологического титра фага на порядок по сравнению с контролем, чего не наблюдалось для препарата более длительного хранения. Таким образом, мы предполагаем, что белок gr84 в составе вириона может взаимодействовать с кишечным муцином, повышая инфекционность фаговых частиц.

Исходя из полученных результатов можно заключить, что белки gr84, gr61 и gr47 обуславливают формирование полноценной инфекционной частицы фага ф24В. Более того, кишечный муцин оказывает активирующее действие на вирионы, имеющие в своем составе полноразмерный белок gr84.

# ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Э.О. Ладнов<sup>216</sup>, П.А. Зайцев<sup>217</sup>, Б.М. Шурыгин<sup>218</sup>, А.Е. Соловченко<sup>219</sup>

Изучение микробных сообществ – одно из важнейших направлений современной экологии. Микробные сообщества, особенно альго–бактериальные сообщества (АБС), играют ключевую роль в функционировании водных экосистем. АБС – устойчивые консорциумы, являющиеся симбиозом гетеротрофных и оксигенных фототрофных микроорганизмов (ОФМ). Физиологические особенности и функциональная роль компонентов АБС может меняться под взаимным влиянием и действием абиотических факторов. Хотя метагеномный анализ микробиома АБС позволяет получать последовательности и предсказывать функциональную роль микроорганизмов в составе сообщества (в том числе некультивируемых), функциональный потенциал многокомпонентных АБС оценивать сложно. Для развития метагеномики АБС требуется расширение геномных баз данных ОФМ, повышение производительности и доступности инструментов для метагеномного секвенирования АБС, а также развитие алгоритмов для функционального профилирования сообществ. Цель работы — создание алгоритма функционального профилирования альго–бактериальных сообществ с получением интегрального значения степени соответствия микробиома заданному функциональному профилю по результатам секвенирования полного метагенома АБС.

Метагеномные чтения были получены в результате секвенирования на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT) суммарной ДНК АБС, инкубируемого в эффлюенте сточных вод, собранных после третичной ступени очистки на водоочистных сооружениях г. Звенигород и содержащих до 10 мг/л фосфат–иона.

Эталонные функциональные профили составляли из нуклеотидных последовательностей и их метаданных: идентификатора в NCBI, название гена, название организма, из генома которого взят ген. Поиск проводили по ключевому слову, связанному с определенным метаболическим процессом, например “polyphosphate”. Поиск эталонных последовательностей вели в базе данных NCBI GenBank, а также в литературных источ-

<sup>216</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>217</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>218</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

<sup>219</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

никах. Для прокариотических и эукариотических организмов формировали отдельные функциональные профили с использованием автоматизации (скриптов на языке Python с использованием библиотек Beautiful Soup и pandas).

Сопоставление эталонных профилей с полученным метагеномом проводили средствами алгоритма BLAST путем выравнивания последовательностей из подготовленных профилей с последовательностями метагеномных чтений каждого АБС. Из последовательностей метагеномных чтений формировали внутреннюю базу данных с помощью команды *makeblastdb*. Затем последовательно провели сравнение нуклеотидных последовательностей по шести рамкам считывания, транслируя их в аминокислотные последовательности, с помощью команды *tblastx*, с каждым из функциональных профилей – прокариотическим и эукариотическим.

Выдачу BLAST анализировали с помощью скрипта на языке Python, осуществляющим: 1) фильтрацию по значениям *e\_value*, 2) сортировку значений по чтениям, 3) расчёт для каждого чтения значения степени соответствия заданному функциональному профилю по формуле (1), 4) нормирование расчетных значений и вычисление интегрального значения степени соответствия АБС эталонному функциональному профилю.

$$(1) T = \sum_{i=1}^m \left( \frac{\sum_{k=1}^n b_i p_i}{n} \right)_j,$$

где  $T$  – интегральное значение степени соответствия микробиома заданному функциональному профилю,  $b$  – bit score (по выдаче BLAST),  $p$  – %identity (по выдаче BLAST),  $n$  – число совпадений у одного чтения,  $m$  – число чтений в метагеноме сообщества.

Получены интегральные значения степени соответствия микробиома АБС разработанным функциональным профилям в течение пяти недель инкубации в сточных водах. На начальном этапе инкубации АБС репертуар и (или) копияемость генов, связанных с метаболизмом полифосфатов, были наибольшими, но значительно уменьшились после первой недели адаптации АБС к условиям инкубации. Впоследствии значения этих параметров вновь выросли, а затем стабилизировались. Результаты наших исследований согласуются с актуальными представлениями о динамике микробных популяций в эвтрофицированных водоёмах. Так, интенсивное поглощение макронутриентов (таких как фосфор) приводит к резкому падению их доступности и выпадению некоторых организмов из состава АБС с соответствующим сужением внутреннего разнообразия его метагенома. Добавление лимитирующего нутриента обеспечивает частичное восстановление численности и разнообразия микроорганизмов в составе АБС.

# ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ ОРГАНИЧЕСКОГО СУБСТРАТА В АППАРАТЕ ВИХРЕВОГО СЛОЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ВЫХОДА АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ

А.А. Лайкова<sup>220</sup>, А.А. Ковалев<sup>221</sup>, Д.А.Ковалев<sup>222</sup>, Е.А. Журавлева<sup>223, 224</sup>,  
С.В. Шехурдина<sup>225</sup>, А.А. Иваненко<sup>226, 227</sup>, Ю.В. Литти<sup>228, 229</sup>

Анаэробная переработка – это безопасный и устойчивый метод утилизации органических отходов, позволяющий снизить экологическую нагрузку на окружающую среду за счет получения «зеленой» энергии, в частности, водорода и метана. Водород является основным продуктом стадии ацидогенеза, в то время как метан представляет собой конечный продукт анаэробного сбраживания (АС). Для одновременного получения  $\text{CH}_4$  и  $\text{H}_2$  активно изучается технология двухстадийного АС в сравнении с одностадийным АС, при этом ключевым параметром производительности процесса является энергетический выход. Физическая предобработка является эффективным способом усиления микробной продукции целевых газов за счет повышения биодоступности субстрата при АС реальных отходов [1]. Дополнительным подходом для увеличения энергетического выхода  $\text{CH}_4$  и  $\text{H}_2$  является внесение в субстрат соединений железа, благотворно влияющих на активность гидрогеназ, а также на вне- и внутриклеточный перенос электронов.

Целью данной работы является оценка технологических параметров одно- и двухстадийного АС предварительно обработанной в аппарате вихревого слоя (АВС) модельной

<sup>220</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>221</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>222</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>223</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>224</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>225</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>226</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>227</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

<sup>228</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>229</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

смеси органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) в периодических условиях. В качестве модели ОФ-ТКО использовался комбикорм для крупного рогатого скота К-65 для обеспечения постоянного состава, как и в предыдущих исследованиях [2]. В качестве инокулята для первого этапа двухстадийного АС использовалась чистая культура водородпродуцирующей бактерии *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2. На втором этапе, а также для одностадийного АС в качестве метаногенного инокулята использовался термофильно сброженный осадок сточных вод Череповецких очистных сооружений. Инкубация проводилась в анаэробных условиях в герметично закрытых флаконах объемом 120 мл при 55 °С с перемешиванием (121 об/мин). Принцип предварительной обработки в АВС заключается в измельчении субстрата внутри камеры, содержащей цилиндрические ферромагнитные истираемые рабочие тела (РТ, соотношение длина:диаметр = 15–20) с высокой скоростью в течение определенного времени (гидравлического времени удержания, ГВУ). В ходе обработки в АВС субстрат измельчается и насыщается микро- и наночастицами нулевалентного железа Fe<sup>0</sup>. Для создания плана эксперимента применяли полный факторный дизайн (Full Factorial Design, FFD) с использованием программного обеспечения DesignExpert. Для исследования были выбраны три фактора: масса рабочих тел (г/л), ГВУ в камере АВС (с) и содержание органического вещества (ОВ) в субстрате (г/л). На основе FFD были определены 9 режимов предварительной обработки (АВС1-АВС9), отличающиеся различной комбинацией значений факторов. Минимальные и максимальные значения для массы рабочих тел составили 100 и 500 г/л, для ГВУ – 30 и 90 с, для концентрации ОВ – 20 и 60 г/л. После каждого из режимов предварительной обработки концентрация железа в субстрате составляла от 29,4 мг/л (АВС2, АВС8) до 90,2 мг/л (АВС4) в зависимости от выбранного режима. В ходе первой стадии двухстадийного АС наибольший выход водорода был зафиксирован при сбраживании субстрата, обработанного в режиме АВС1 (500 г/л РТ, ГВУ 30 с, 60 г ОВ/л), и составил 71,9 мл/г ОВ. Наибольший выход метана в ходе второй стадии – для режима АВС5 (300 г/л РТ, ГВУ 60 с, 40 г ОВ/л) составил 264,5 мл/г ОВ. В результате одностадийного АС наибольший выход метана составил 401,8 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ также для режима предобработки АВС5. На основании методологии поверхности отклика (RSM) была проведена оптимизация режима предварительной обработки по количеству энергии, затраченной на намол (удельное количество железа в субстрате). Для режима АВС4 была обнаружена максимальная концентрация частиц Fe<sup>0</sup> в субстрате, однако с учетом затрачиваемой на процесс энергии (и, следовательно, ГВУ), оптимальным режимом предварительной обработки является АВС1. С точки зрения общего энергетического выхода наиболее эффективным в двухстадийном АС является предобработка субстрата в режиме АВС1 (11,026 кДж/г ОВ), а в одностадийном АС – АВС5 (16,016 кДж/г ОВ). С учетом энергетических затрат на предварительную обработку в АВС, экономически выгодными оказались режимы АВС1 и АВС9 (более 175%) для двухстадийного АС, и АВС1, АВС5, АВС7 и АВС9 (более 237%) для одностадийного АС. Был проведен анализ относительной численности

основных микробных групп в метаногенном инокуляте, а также в пробах с субстратами, обработанными по режимам АВС1 и АВС5, для которых был показан наилучший выход энергии в результате двухстадийного и одностадийного АС, соответственно. Наблюдались существенные различия между доминирующими микробными группами в метаногенных сообществах. В АВС1 относительная численность предположительно синтрофных представителей *Coprothermobacter* и *Syntrophomonadaceae* была выше по сравнению с АВС5, в то время как в АВС5 были более многочисленны ацидогенные группы *Clostridium sensu stricto* 1 и *Clostridium sensu stricto* 7. Присутствие гидролитических родов, таких как *Herbinix* и *Caproiciproducens*, предположительно, определялось типом субстрата, богатого полимерами.

Результаты данной работы показывают возможность повышения энергоэффективности одностадийного АС в сравнении с двухстадийным за счет подбора оптимального режима предобработки в АВС, что в перспективе позволит существенно сократить экономические затраты и удешевить процесс переработки органических отходов.

#### Список литературы:

1. Bundhoo M. A. Z., Mohee R., Hassan M.A. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review //Journal of environmental management. – 2015. – Т. 157. – С. 20–48.
2. Kovalev A.A., Kovalev D.A., Nozhevnikova A.N., Zhuravleva E.A., Katraeva I.V., Grigoriev V.S., Litti Y.V. Effect of low digestate recirculation ratio on biofuel and bioenergy recovery in a two-stage anaerobic digestion process //International Journal of Hydrogen Energy. – 2021. – Т. 46. – №. 80. – С. 39688–39699.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №22-49-02002.*

# ОСОБЕННОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДВУХ ЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГА *RAOUTELLA SPP*

А.М. Лендел<sup>230</sup>, Н.П. Антонова<sup>231</sup>, Е.В. Усачёв<sup>232</sup>, Д.В. Васина<sup>233</sup>

Лизины – это литические ферменты бактериофагов, основная функция которых заключается в расщеплении пептидогликана бактериальной клеточной стенки. Модульный характер эволюции многих генов бактериофагов обуславливает высокую степень гомологии первичной последовательности лизинов с разнообразными в функциональном плане белками. Так, было показано, что геном бактериофага RO1, инфицирующий грамотрицательную бактерию *Raoultella ornithinolytica*, несет в себе последовательности двух однодоменных негомологичных лизинов, предположительно, функционирующих как эндолизины. Интересно, что ни один из прежде упомянутых ферментов не относится к гликозил-гидролазам GH24 – наиболее распространенному и хорошо изученному классу эндолизинов бактериофагов грамотрицательных бактерий. Один из лизинов Ro1, LysRO1, принадлежит к группе гидролитических ферментов GH19, представители которых известны не только как лизины бактериофагов, но так же как растительные и бактериальные хитиназы. Другой фермент, LysSPRO, родственен гидролазе SleB, участвующей в прорастании спор *Bacillus spp.* Поскольку особенности антибактериального действия эндолизинов позволяют рассматривать их в качестве перспективной основы лекарственных средств, изучение лизинов Ro1 имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. В рамках создания панели перспективных для медицины энзимотиков, мы поставили цель охарактеризовать антибактериальные свойства рекомбинантных ферментов на основе генетических последовательностей лизинов Ro1.

Рекомбинантные белки LysSPRO и LysRO1, ко-трансляционно сшитые с октагистидиновым тагом, были получены в результате четырехчасовой экспрессии в *Escherichia coli* в составе конструкций, соответственно основанных на последовательностях HWB37\_gr003 или HWB37\_gr095. Очистку лизинов проводили с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами никеля. В ходе дальнейшей работы мы исследовали противомикробное действие очищенных ферментов в отношении планктонных бактерий и биопленок. Антибактериальную активность оценивали с помощью мето-

<sup>230</sup> ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

<sup>231</sup> ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

<sup>232</sup> ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

<sup>233</sup> ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

да посева суспензии обработанных клеток и подсчёта КОЕ на чашке. Спектр рабочих концентраций (0,1–100 мкг/мл) определяли с помощью 5 штаммов различных видов из коллекции АТСС, спектр чувствительных к действию бактерий устанавливали, используя штаммы АТСС и изоляты в составе местной коллекции. Действие эндолизинов на сформированные биопленки детектировали с помощью окрашивания биомассы кристаллическим фиолетовым.

Мы установили, что LysSPRO и LysRO1, начиная с концентрации 1 мкг/мл в 20 mM Tris-HCl pH 7,5, проявляли заметное антибактериальное действие в отношении различных штаммов. В концентрации 100 мкг/мл, исследуемые ферменты были активны в отношении представителей видов *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, приводя к снижению титра бактерий на несколько порядков; были менее эффективны в отношении рода *Salmonella*, и не проявляли активности в отношении *Proteus mirabilis*. Интересно, что LysSPRO также эффективно действовал на *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, в то время как LysRO1 проявлял более выраженную антибактериальную активность в отношении энтеробактерий. Помимо этого, LysSPRO и LysRO1 можно охарактеризовать как белки с явным противобиопленочным действием. Так, 10 мкг/мл каждого из ферментов было достаточно для снижения биомассы биопленок *K. pneumoniae* и *A. baumannii* не менее чем в 2 раза. В то же время, мы не наблюдали значительного снижения биомассы пленок *P. aeruginosa*, обработанных этими лизинами. Исследование скорости антибактериального действия показало, что ферменты способны действовать на клетки чувствительного штамма клебсиеллы с первых минут обработки, и, в отличие от LysRO1, эффект от LysSPRO значительным образом замедлялся спустя полчаса инкубации.

Таким образом, мы предполагаем, что исследуемые ферменты характеризуются широким спектром чувствительных бактерий: в случае LysRO1 – это преимущественно энтеробактерии, в случае LysSPRO – аналогичная специфичность к семейству выражена слабее. Эти свойства, наряду с противобиопленочной активностью и особенностями скорости антибактериального действия, утверждают лизины Ro1 в качестве кандидатных биомолекул для дальнейшего изучения как потенциальной основы препаратов в терапии трудноизлечимых инфекций.

# МЕТАГЕНОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРОКАРИОТ, НАСЕЛЯЮЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ ЧАСТИ ЧЕРНОГО ТРЮФЕЛЯ *TUBER MACROSPORUM*

Е.В. Малыгина<sup>234</sup>, Н.А. Имидоева<sup>235</sup>, Н.С. Потапова<sup>236</sup>,  
Т.Н. Вавилина<sup>237</sup>, А.Ю. Бельшенко<sup>238</sup>, А.А. Баталова<sup>239</sup>,  
В.М. Жиленков<sup>240</sup>, М.М. Моргунова<sup>241</sup>, Д.В. Аксёнов-Грибанов<sup>242</sup>

Трюфельные грибы выступают ценным и малоизученным биологическим объектом, Микробиом трюфеля в основном состоит из почвенных микроорганизмов и представлен уникальными и редкими семействами бактерий. Данные бактерии, как предполагается, могут участвовать в формировании их плодовых тел поскольку механизм этого процесса до сих пор неизвестен [1].

Целью данного исследования выступало метагеномное профилирование прокариот, населяющих перидий и глебу российского трюфельного гриба *T. macrosporum*. Плодовые тела черного трюфеля были собраны в окрестностях города Краснодар. Фрагменты плодовых тел (n = 6) отобраны для анализа разнообразия прокариот. Анализ проводили с помощью метагеномного профилирования по гену 16S рРНК. Биоинформатическую обработку данных проводили с помощью программы Fast QC, алгоритма DADA2 и базы данных SILVA.

Согласно материалам метагеномного анализа, сообщество прокариот, населяющих *T. macrosporum* (OTU в перидии 76,55±3,9%; OTU в глебе 97,59±4,6%), состояло из следующих классов: Alphaproteobacteria (OTU 31,01±35,35 %), Actinobacteria (OTU 8,22±4,73 %), Gammaproteobacteria (OTU 2±24,92 %), Bacilli (OTU 1,49±20,21 %), Saccharimonadia (OTU 1,42±1,23 %), а также классами Clostridia, Cyanobacteriia, Planctomycetes, Bacteroidia, Cyanobacteriia, Desulfurobacteriia (<1%).

Сообщество прокариот плодового тела *T. macrosporum* представлено 27 семействами (Рис. 13). Доминирующим группами были семейства бактерий Lachnospiraceae spp. (OTU

<sup>234</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>235</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>236</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>237</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>238</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>239</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>240</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>241</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

<sup>242</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

58,23%), Streptococcaceae spp. (OTU 49,75 %), Yersiniaceae spp. (OTU 33,73), Mitochondria spp. (OTU 19,02±32,78 %), Rhizobiaceae spp. (OTU 14,38±10,64 %), Geitlerinemaceae spp. (OTU 12,99%), Flavobacteriaceae spp. (OTU 12,98), Nocardioidaceae spp. (OTU 10,11 %). В группу минорных групп вошли такие семейства, как Lactobacillaceae spp. (OTU 5,63 %), Clostridiaceae spp. (OTU 5,14 %), Listeriaceae spp. (OTU 3,43 %), Xanthobacteraceae spp. (OTU 3,39±1,28 %), и т.д.

Так, семействами бактерий, обнаруженными только в перидии, являлись Clostridiaceae spp., Dongiaceae spp., Flavobacteriaceae spp., Lachnospiraceae spp., Lactobacillaceae spp., Micrococcaceae spp., Mycobacteriaceae spp., Nocardioidaceae spp., Paenibacillaceae spp., Streptococcaceae spp., Vagococcaceae spp.

Оценка метагенома трюфельного гриба *T. macrosporum* позволила обнаружить несколько родов бактерий, встречающихся только в его сердцевине. Такими организмами являлись Erysipelatoclostridiaceae spp. (OTU 12,21 %), Pseudomonadaceae spp. (OTU 1,87 %), Enterobacteriaceae spp. (OTU 1,48 %), Reyraneliaceae spp. (OTU 1,24 %).

Доминирующими семействами бактерий населяющих и перидий и глебу являлись семейства Geitlerinemaceae spp., Rhizobiaceae spp. Предположительно, данные семейства бактерий могут играть роль в механизме формирования микоризы трюфеля с корнями растений-хозяев. Например, семейство Rhizobiaceae spp. включает виды азотфиксирующих бактерий, которые помогают растениям фиксировать азот. Семейство Geitlerinemaceae spp. содержит виды цианобактерий, которые в свою очередь используются в качестве биоудобрений [2]. Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлены микроорганизмы, в высокой степени ассоциированные с плодовыми телами грибов. Впервые в истории трюфельводства описаны культуры, населяющие перидий и глебу плодовых тел.

### Список литературы:

1. Zambonelli et al. True Truffle (Tuber spp.) in the world. // Springer International Publishing, Cham. SOILBIOL, Switzerland. 2016. V. 47, P. 401.
2. Rubin-Blum M. et al. Tar patties are hotspots of hydrocarbon turnover and nitrogen fixation during a nearshore pollution event in the oligotrophic southeastern Mediterranean Sea //Marine Pollution Bulletin. – 2023. – Т. 197. – С. 115747.

*Работа выполнена при финансовой поддержке проектов  
Российского научного фонда No 22-76-10036.*

# НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА – ЭСТРАДИОЛА, АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА, НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ТИПА А – НА РОСТ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМОВ-КОММЕНСАЛОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

С.В. Мартьянов<sup>243</sup>, Е.В. Дювенжи<sup>244</sup>, Е.Л. Здоровенко<sup>245</sup>, Р.Х. Зиганьшин<sup>246</sup>,  
М.И. Щелкунов<sup>247, 248</sup>, В.М. Терешина<sup>249</sup>, Е.А. Януцевич<sup>250</sup>, О.А. Данилова<sup>251</sup>,  
Е.Д. Неволлина<sup>252</sup>, А.М. Мосолова<sup>253</sup>, Н.А. Логинова<sup>254</sup>,  
М.В. Журина<sup>255</sup>, В.К. Плакунов<sup>256</sup>, А.В. Ганнесен<sup>257</sup>

**Введение.** Микробная эндокринология в настоящее время одно из достаточно интенсивно развивающихся направлений исследований, находящееся на стыке микробиологии, физиологии (в т.ч. нейрофизиологии) и эндокринологии. Объектом исследований в микробной эндокринологии являются взаимоотношения микроорганизмов и организма-хозяина (человека) на уровне сигнальных молекул – нейромедиаторов, гормонов, нейропептидов.

**Цели работы.** В нашей работе мы исследовали различные аспекты влияния гормонов на физиологию и биохимию моновидовых и бинарных биопленок избранных представителей микробиоты человека, в частности – микробиоты кожи и слизистых человека. В ходе исследований изучали:

<sup>243</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>244</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>245</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской Академии наук

<sup>246</sup> Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук

<sup>247</sup> Сколковский институт науки и технологий

<sup>248</sup> Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича Российской Академии наук

<sup>249</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>250</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>251</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>252</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>253</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>254</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>255</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>256</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

<sup>257</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук

1) влияние норадреналина, натрийуретического пептида А-типа на биохимический состав матрикса биопленок *Lactobacillus paracasei* и *Kytococcus schroeteri*; а также адреналина на матрикс биопленок *Micrococcus luteus* НВ. количественными методами (соотношение основных полимерных компонентов матрикса), с помощью спектроскопии методом ядерно-магнитного резонанса (полисахаридный состав) и хроматографически (липидный состав).

2) Влияние адреналина на рост биопленок *M. luteus* НВ на тефлоновых кубиках и стекловолоконных фильтрах методами окраски кристаллическим фиолетовым, подсчета КОЕ и окраски метаболизируемым красителем МТТ

3) Влияние эстрадиола на экспрессию генов в биопленках *M. luteus* C01

4) Влияние эстрадиола (и этанола как растворителя) на активность антибиотика тетрациклина в отношении моновидовых и бинарных биопленок *K. schroeteri* и *L. paracasei*

**Анализ биохимического состава матрикса биопленок.** В ходе работы показано, что гормоны оказывали значительный эффект на биохимический состав матрикса моновидовых биопленок. Так, эстрадиол в концентрации  $2.2 \times 10^{-8}$  М (100× нормальная в плазме крови человека) повышал (около 25%) количество органического вещества матрикса во фракции тяжелых молекул, проходящих ниже по градиенту хлорида цезия в процессе центрифугирования. Адреналин понижал количество ДНК во фракции легких молекул в матриксе биопленок *M. luteus* НВ (понижение составляло около 15%, определено методом Дише). Присутствие ANP в среде серьезно понижало количество полисахаридов матрикса *K. schroeteri* (после 24 ч культивирования количество полисахаридов понижалось более чем в 3 раза согласно результатам применения антронового метода).

**Анализ липидов биопленок.** Количество липидов в матриксе биопленок зависит от времени культивирования и типа липидов. Изученные активные вещества также серьезным образом меняли липидный состав матрикса биопленок. Липидный состав *M. luteus* НВ был богаче, чем у *K. schroeteri*. Адреналин понижал количество липидов матрикса биопленок *M. luteus* НВ, за исключением свободных жирных кислот (СЖК), стероловых эфиров и НЛ. У трех последних он повышает содержание их в матриксе.

Эстрадиол способен регулировать липидный состав матрикса биопленок *L. paracasei* АК508. Эффект зависит от типа липидов и от концентрации гормона. Этанол также является регуляторным соединением для синтеза липидов лактобациллами.

**Анализ полисахаридов биопленок.** Гликополимеры трех типов были выделены из клеточных стенок *L. paracasei* АК508 после последовательной экстракции сначала ледяной, потом горячей 10% ТХУ.

Следующая структура обнаружена у гликополимеров, выделенных из матрикса *M. luteus* НВ, и определена с помощью композиционного анализа и 1D- и 2D-ЯМР-спектроскопии:

→4)-α-D-GalpNAc-(1→2)-R-2HO-Glt-(5→2)-D-Asn2Ac-(1→4)-α-D-QuipNAc4N-(1→

Где D-Asn обозначает D-аспарагин, а R-2HO-Glt – 2-гидроксиглутаровую кислоту.

**Исследование экспрессии генов *M. luteus* C01 в присутствии эстрадиола.** В ходе работы определены гены с измененным уровнем экспрессии в присутствии эстрадиола (относительно образцов с добавлением этанола в качестве контроля, табл. 1).

Таблица 1.

Идентификатор	Название белка	Экспрессия
MLUT_RS18830	Гипотетический белок	Повышается
MLUT_RS22785	цистатионин-гамма-лиаза	Понижается
MLUT_RS22845	КоА-лигаза длинноцепочечных жирных кислот	Понижается
MLUT_RS22935	N-ацетилтрансфераза семейства GNAT	Понижается
MLUT_RS22950	Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа-оксидаза	Понижается
MLUT_RS22955	Белок семейства аквапоринов	Понижается
MLUT_RS22960	Глицеролкиназа GlpK	Понижается

Изменение экспрессии генов в биопленках *M. luteus* C01 в присутствии эстрадиола

**Влияние адреналина на рост биопленок *M. luteus* НВ.** В отличие от кожного комменсального штамма *M. luteus* C01, рост биопленок которого стимулируется в присутствии адреналина, штамм *M. luteus* НВ ингибируется гормоном, что выразилось как в понижении общего количества биомассы на тефлоновых кубиках (на 17%) , так и в понижении числа КОЕ в биопленках более чем в 2 раза. При этом, как и у кожного штамма, наибольшее влияние адреналин оказывал в физиологической (нормальной) концентрации –  $4.9 \times 10^{-9}$  М.

**Влияние эстрадиола на активность тетрациклина в отношении биопленок.** Показано, что эстрадиол в концентрации  $2.2 \times 10^{-8}$  М способен усиливать действие тетрациклина в концентрации 0.01 мкг/мл на моновидовые и бинарные биопленки *K. schroeteri* Н01 и *L. paracasei* АК508. В зависимости от типа биопленок, увеличение ингибирующего эффекта антибиотика варьирует, но во всех случаях оно является большим в разы по отношению к эффекту антибиотика без добавок. Например, китоккокки, нечувствительные к антибиотику, в присутствии гормона подавляются на более чем 40%. Это открывает огромные перспективы для медицинского применения эстрадиола при лечении инфекций традиционными антибиотиками.

# НОВЫЕ АНАЭРОБНЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ОХОТСКОГО МОРЯ

С.С. Махортых<sup>258, 259, 260</sup>, Я.В. Рыжманова<sup>261</sup>, В.А. Щербакова<sup>262</sup>

Морские донные отложения представляют собой сложную экосистему, в которой сосредоточено значительное разнообразие микроорганизмов, играющих ключевую роль в биогеохимических циклах. Северо-восточный изгиб Курильской котловины Охотского моря содержит зоны глубинных разломов с активным мезофильным и термофильным микробным сообществом, адаптированным к различным условиям, таким как низкие и высокие температуры, высокое давление и дефицит кислорода. Бактерии, населяющие донные отложения, участвуют в процессах разложения органического вещества, метаногенезе, нитрификации и сульфатредукции, обеспечивая обмен веществ в донных осадках. Исследование биоразнообразия этих организмов важно для понимания функционирования морских экосистем и оценки их реакции на изменения окружающей среды.

**Цель работы:** характеристика новых термофильных анаэробных микроорганизмов из донных отложений северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря.

**Объекты исследования:** образцы донных осадков, отобранные во время рейса № 92 на НИС «Академик А.М. Лаврентьев» с 17.04.21 по 26.05.21, на станциях LV47 (50° 51'545 с.ш., 155°30'66 в.д.) с глубины 786 метров (горизонт 100 см) и LV49 (50°54'543 с.ш., 155°14'296 в.д.) с глубины 996 метров (горизонт 50 см) стали источниками получения анаэробных термофильных накопительных культур. На следующем этапе методом десятикратных разведений при температуре 55 °С из накопительных культур были выделены штаммы анаэробных бактерий, обозначенные нами как LV47 и LV49.

---

<sup>258</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>259</sup> Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» Пушкино, Россия

<sup>260</sup> E-mail: sonyamakh@yahoo.com

<sup>261</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>262</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

**Результаты:** Клетки штаммов LV47 и LV49 были представлены прямыми подвижными спорообразующими палочками размером 0.2-0.4×2.0-4.0 и 0.5×2.0-4.0 мкм соответственно.

Филогенетический анализ полученных последовательностей генов 16S рРНК показал, что штамм LV47 относится к роду *Tepidibacillus*, его ближайшим родственником является *Tepidibacillus fermentans* STGH<sup>T</sup>, выделенный из подземного хранилища газа, со сходством 97.8%. Ближайшим родственником штамма LV49 являлся *Thermoanaerobacter mathranii* A3<sup>T</sup>, выделенный из горячего источника, со сходством 99.1% (Рис. 1).

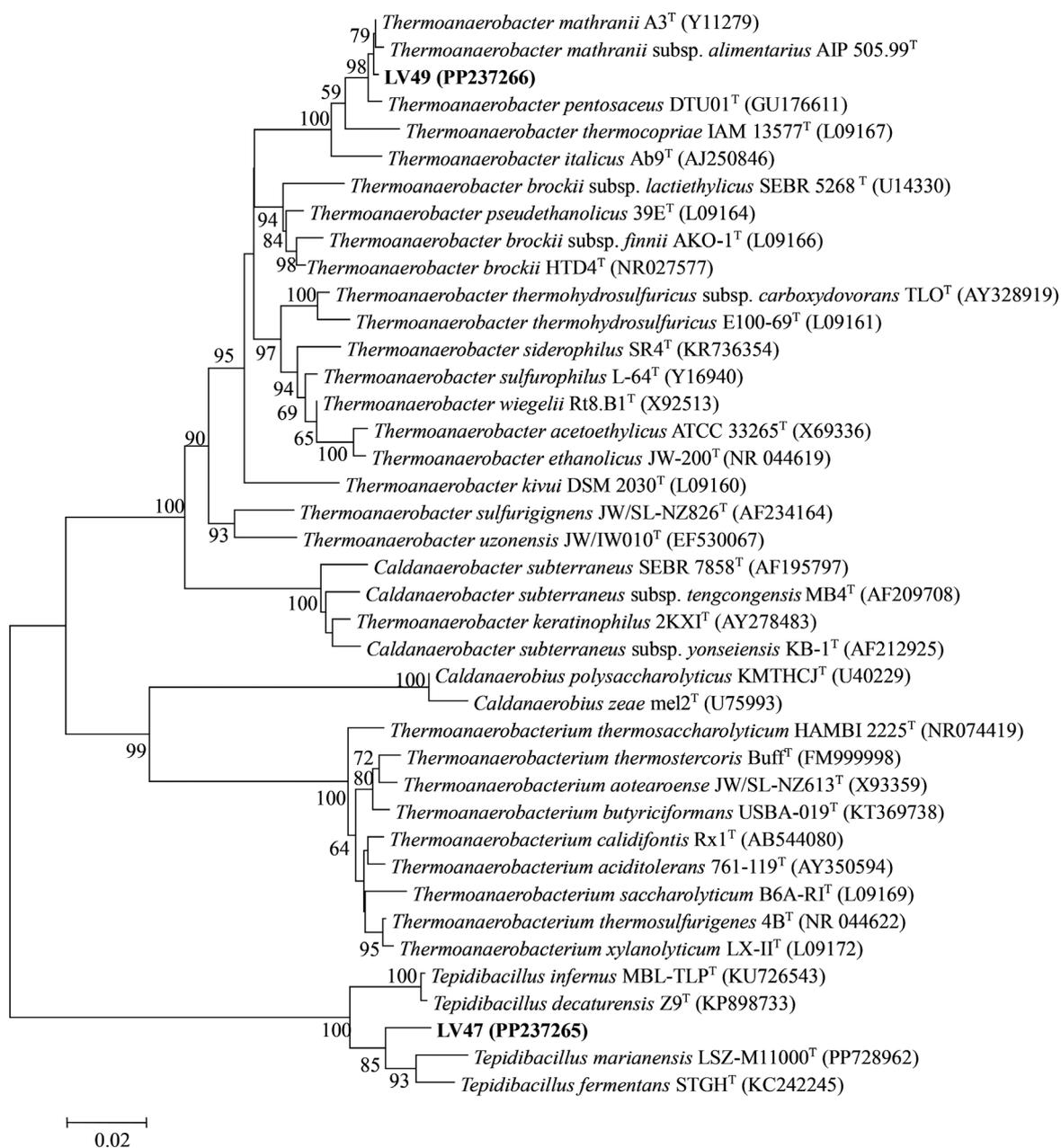


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штаммов LV47 и LV49 среди представителей родов *Tepidibacillus* и *Thermoanaerobacter*

Штамм LV47 рос в диапазоне температур от 35 до 70 °С оптимумом 65 °С, не нуждался для роста в NaCl (оптимум 2 г/л NaCl), выдерживал соленость до 30 г/л. Изолят рос в широком диапазоне рН от 5.4 до 8.8 с оптимумом рН 6.25. Облигатно зависел от наличия дрожжевого экстракта в ростовой среде. В качестве доноров электронов использовал сахара, пептон, триптон и дрожжевой экстракт. В качестве акцепторов электронов в присутствии глюкозы – элементную серу, нитрат, тиосульфат, AQDS, Fe(III) цитрат, аморфное Fe(III). Штамм LV47 был способен сбраживать дрожжевой экстракт без акцепторов электронов. Доминирующими жирными кислотами клеточных стенок были C<sub>16:0</sub> (28.32%), i-C<sub>16:0</sub> (24.31%), i-C<sub>15:0</sub> (13.22%) и ai-C<sub>15:0</sub> (12.8%). У штамма LV47 был секвенирован геном размером 2.25 Мп с завершенностью 99.23% и контаминацией 2.56% (по CheckM); содержание Г+Ц пар в ДНК 36.94%. Уровень ANI и ДНК–ДНК гомологии с *T. fermentans* STGH<sup>T</sup> составил 86.55 и 30.3% соответственно. Уровень генотипических и фенотипических отличий позволяют предположить, что штамм LV47<sup>T</sup> (=ВКМ В-3744Т) является типовым штаммом нового вида рода *Therpidibacillus*.

Для штамма LV49 был характерен рост в диапазоне температур от 55 до 75 °С с оптимумом 65 °С. Он также не нуждался в NaCl для роста, однако оптимальный рост наблюдали при содержании 2 г/л NaCl. Изолят рос в диапазоне рН от 5.8 до 8.3 с оптимумом рН 7.6. Облигатно зависел от наличия дрожжевого экстракта в ростовой среде. В качестве доноров электронов использовал сахара, триптон, пектин, сорбитол, маннитол, ксилан и салицин. В качестве акцепторов электронов – сульфит, тиосульфат, арсенат. Доминирующими жирными кислотами в клеточных стенках штамма являлись ai-C<sub>15:0</sub> (67.33%) и i-C<sub>17:0</sub> (12.98%). У штамма LV49 был секвенирован геном размером 2.2 Мп с завершенностью 99.52% и загрязненностью 0.00% (по CheckM); содержание Г+Ц пар в ДНК составило 34.01%. Уровень ANI и ДНК–ДНК гомологии с *T. mathranii* A3<sup>T</sup> составил 98.6 и 89.3% соответственно.

По предварительным данным уровень генотипических и фенотипических отличий позволяют предположить, что штамм LV49 (=ВКМ В-3745) является представителем нового подвида вида *Thermoanaerobacter mathranii* A3<sup>T</sup>.

**Выводы:** Проведенные исследования позволили впервые выделить из донных осадков Охотского моря два новых термофильных штамма LV47<sup>T</sup> и LV49. Изучение первичных характеристик штамма LV47<sup>T</sup> свидетельствуют о его таксономической обособленности и необходимости описать этот штамм в качестве представителя нового типового вида рода *Therpidibacillus*. Термофильные бактерии вида *T. mathranii* (штамм LV49) впервые обнаружены в глубоководных морских осадках. Дальнейшее изучение геномов изолятов позволит понять их метаболические возможности, позволяющие адаптироваться к природным местам обитания.

# ПОИСК ПРИЗНАКОВ СИНТРОФНОГО ОБРАЗА ЖИЗНИ В ГЕНОМАХ СУЛЬФАТРЕДУКТОРОВ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ

А.Д. Мельник<sup>263</sup>, А.Р. Строева<sup>264</sup>, А.Ю. Меркель<sup>265</sup>

Синтрофные ассоциации микроорганизмов остаются одной из малоизученных тем современной микробиологии, особенно в контексте малоисследованных регионов Арктики. В составе микробных сообществ, сформированных под влиянием нефтегазоносных структур, могут существовать уникальные экологические связи между отдельными организмами, образующие симбиозы или синтрофные ассоциации микроорганизмов (Knittel et al., 2005, Ruff et al., 2013). Примером таких связей могут быть синтрофные консорциумы метанотрофных архей и сульфатредуцирующих бактерий, которые в изобилии обитают в местах фокусированной флюидоразгрузки на морском дне (Voetius et al., 2000; Orphan et al., 2001). Таким образом, целью работы является оценка потенциала обнаруженных в арктических морях некультивируемых сульфатредукторов к синтрофному образу жизни.

В основу работы положены данные, полученные в ходе трех экспедиций: 20-го и 21-го рейсов «Training-through-Research» (TTR) в северной части Баренцева и в северо-восточной части Карского морей, а также коммерческого рейса в Восточно-Сибирском море. В ходе пробоотбора гравитационной трубкой были отобраны пробы донных отложений, из которых отбирались образцы с глубин 5-15 см под поверхностью дна. Для первичной оценки состава микробных сообществ был использован участок гена 16S рРНК, соответствующий участку V4 или V3-V4. Метагеномное секвенирование было выполнено методом “shotgun” на системе HiSeq 2500 (Illumina). Полноту и контаминацию бинов оценивали с помощью CheckM. Таксономическое положение присваивалось каждому бину с помощью GTDBtk. Методами метагеномного секвенирования исследованы три генома некультивируемых сульфатредукторов, полученные из метагеномов образцов донных отложений исследуемых морей. Результаты сборов геномов, собранных из метагеномов представлены в таблице 1.

На основе 120 консервативных однокопийных генов собранных геномов было построено филогенетическое дерево порядка C00003060 (р. *Desulfobacterota*) (рис. 1). Согласно Murali et al. (2023), порядок C00003060 включает в себя большое количество

<sup>263</sup> Институт проблем нефти и газа РАН, Москва, Россия

<sup>264</sup> Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>265</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия



ления метана (архей ANME-2b и представителей бактериальной клады Seep-SRB1). Образцы донных отложений Карского и Баренцева морей с повышенными концентрациями метана содержали большое количество некультивируемых сульфатредукторов, предположительно, родственных облигатным синтрофам Seep-SRB1, обнаруженным в Восточно-Сибирском море. После автоматической аннотации, в геномах сульфатредукторов проводился поиск функциональных генов диссимиляционной сульфатредукции, характерных переносчиков электронов, а также кластеров генов, необходимых для образования мембранных структур, необходимых для осуществления синтрофных взаимодействий.

По итогам биннинга в составе метагенома образца Vigr1 был собран геном малоизученно представителя порядка C00003060 - Vigr1-02 («LCP-80», согласно БД Silva). Согласно результатам филогенетического анализа и анализа функциональных генов, Vigr1-02 является представителем синтрофной клады Seep-SRB1g и предположительно способен осуществлять межвидовой транспорта электронов (DIET) с представителями ANME за счет наличия генов каналоподобных мембранных структур переноса электронов. Kara-03 (Карское море) и Vara-04 (Баренцево море) принадлежат к кладе уровня рода JAFDF001 (внутри порядка C00003060). Было получено противоречивые свидетельства того, что представители JAFDF001 способны образовывать функциональный синтрофный консорциум: гены мембранных структур переноса электронов обнаружены не в полном составе и с небольшим уровнем покрытия. Однако, такие результаты могут быть объяснены менее качественными параметрами сборки геномов образцов Карского и Баренцева морей.

### Список литературы:

1. Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // *Nature*. – 2000. V. 407. №. 6804. P. 623–626.
2. Knittel K., Lösekann T., Boetius A., Kort R., Amann R. Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps // *Applied and environmental microbiology*. 2005. V. 71. №. 1. P. 467–479.
3. Metcalfe K.S., Murali R., Mullin S.W., Connon S.A., Orphan V.J. Experimentally-validated correlation analysis reveals new anaerobic methane oxidation partnerships with consortium-level heterogeneity in diazotrophy // *The ISME Journal*. 2021. V. 15. №. 2. P. 377–396.
4. Murali R., Yu H., Speth D.R., Wu F., Metcalfe K.S., Crémière A., Laso-Pérez R., Malmstrom R.R., Goudeau D., Woyke T., Hatzepichler R., Chadwick G.L., Connon S.A., Orphan, V. J. Physiological potential and evolutionary trajectories of syntrophic sulfate-reducing bacterial partners of anaerobic methanotrophic archaea // *PLoS Biology*. 2023. V. 21. №. 9. P. e3002292.
5. Orphan V.J., Hinrichs K.U., Ussler III W.P.C.K., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M., Delong E.F. Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. V 67. №. 4. P. 1922–1934.
6. Ruff S.E., Arnds J., Knittel K., Amann R., Wegener G., Ramette A., Boetius, A. Microbial communities of deep-sea methane seeps at Hikurangi continental margin (New Zealand) // *PLoS One*. 2013. V. 8. №. 9. P. e72627.

7. Skennerton C.T., Chourey K., Iyer R., Hettich R.L., Tyson G.W., Orphan V.J. Methane-Fueled Syntrophy through Extracellular Electron Transfer: Uncovering the Genomic Traits Conserved within Diverse Bacterial Partners of Anaerobic Methanotrophic Archaea // *MBio*. 2017. V. 8. №. 4. P. 10.1128/mbio.00530-17. Wang F., Gu Y., O'Brien J.P., Sophia M.Y., Yalcin S.E., Srikanth V., Shen C., Vu D., Yi S.M., Yalcin S.E., Srikanth V., Malvankar N.S. Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers // *Cell*. 2019. V. 177. №. 2. P. 361–369. e10.

# ОСМОАДАПТАЦИЯ ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО МЕТИЛОТРОФА *METHYLOBREVIS RAMUKKALENSIS* PK2

О.И. Мельников<sup>266</sup>, О.Н. Розова<sup>267</sup>, В.Н. Хмеленина<sup>268</sup>

Бактерии, обитающие в соленых экосистемах и условиях изменяющейся водной активности, используют специфические механизмы осмоадаптации, включая биосинтез и накопление органических соединений, совместимых с их метаболизмом. У галотолерантных метилотрофов в качестве осмопротекторов обнаружены эктоин и глицин-бетаин, N-ацетилглутаминилглутаминамид (NAGGN) и трегалоза. Механизмы осмоадаптации у метилотрофов, ассоциированных с растениями, не были изучены. У симбиотической бактерии *Sinorhizobium meliloti* выявлено накопление NAGGN в значительных концентрациях, который также встречается у микробных патогенов растений и человека. В геномах некоторых галотолерантных и ассоциированных с растениями метилотрофов найдены гены, кодирующие ферменты биосинтеза NAGGN, такие как ацетилтрансфераза (AsnO) и глутамиламидотрансфераза (Ngg).

Анализ генома галотолерантного метилотрофа *M. ramukkalensis* PK2 выявил генный кластер размером 4,7 кб, содержащий три близко расположенных гена, ответственных за биосинтез N-ацетилглутаминилглутаминамида (NAGGN). Два из этих генов, A6302\_00294 и A6302\_00295, имеют более 50% идентичности с глутамиламидотрансферазой (AsnO) и ацетилтрансферазой (Ngg), которые ранее были обнаружены у *Pseudomonas syringae* и *Sinorhizobium meliloti*. Третий ген кластера кодирует аминоклепептидазу семейства M42, которая предположительно участвует в регуляции уровня NAGGN в ответ на изменения осмотического давления, хотя её точная функция ещё не установлена. Гены, ответственные за биосинтез NAGGN, обнаружены также у других метилотрофов, включая представителей семейств *Huyhomicrobiaceae*, *Methylocystaceae* и *Methylobacteriaceae*, высокая степень гомологии этих генов указывает на консервативную организацию биохимического пути синтеза NAGGN.

Кроме того, у *M. ramukkalensis* PK2 идентифицированы два пути биосинтеза трегалозы, включая гены, кодирующие мальтоолигосилтрегалозосинтазу и трегалозо-6-фосфатсинтазу/трегалозо-6-фосфатфосфатазу. Эти пути типичны для эубактерий

<sup>266</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

<sup>267</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

<sup>268</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

и демонстрируют значительное сходство с аналогичными ферментами у *Pseudomonas syringae* и *Pseudomonas stutzeri*.

В геноме штамма *M. ramukkalensis* PK2 обнаружены гены, кодирующие холиндегидрогеназу (betA) и бетаинальдегиддегидрогеназу (betB), что указывает на возможность биосинтеза бетаина из холина. Также идентифицирован локус, кодирующий ABC-транспортер, схожий с высокоаффинным транспортером холина. Кроме того, в геноме имеются ортологи для компонентов ABC-транспортера, ответственных за транспорт пролина/глицин-бетаина с более 70% идентичностью аминокислотных последовательностей к белкам из *Sinorhizobium fredii*.

В клетках *M. ramukkalensis* PK2, выросших на минеральной среде с метанолом и 0,5% NaCl (в/об) обнаружены невысокие концентрации трегалозы, NAGGN и глутамата, уровни этих соединений возрастали при росте метилотрофа в среде с 6% NaCl (Рис. 1). При добавлении холина в ростовую среду, содержащую 6% NaCl, трегалоза в клетках не обнаруживалась, концентрация глутамата двукратно снижалась, а содержание NAGGN уменьшалось незначительно, при этом скорость роста культуры увеличилась в 3 раза. Очевидно, транспорт холина в клетку с последующей трансформацией его в глицин-бетаин является более выгодным процессом выравнивания осмотического давления цитоплазмы и внешней среды, по сравнению с синтезом *de novo* трегалозы и NAGGN.

В клетках *M. ramukkalensis* PK2, растущих на метаноле или манните, не выявлены различия в содержании перечисленных осмолитов. Очевидно, маннит – известный как осмопротектор у ряда организмов, у штамма PK2 трансформируется с участием маннитдегидрогеназы и фруктокиназы и не вносит вклад в осмоадаптацию (Рис. 2).

У метилотрофов, ассоциированных с растениями, таких как *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, *Hansshlegelia quercus* Dub и *Methylopila capsulata* IM1, обнаружен схожий спектр растворимых метаболитов. При увеличении концентрации NaCl в ростовой среде уровни трегалозы, NAGGN и глутамата увеличивались, при этом трегалоза доминировала в общем пуле метаболитов.

Метилотрофные бактерии, такие как *M. ramukkalensis* PK2, рассматриваются в качестве агентов, перспективных для повышения урожайности сельскохозяйственных культур благодаря способности синтезировать ауксины и разлагать предшественник этилена аминоклопропанкарбоксилат (АЦК). Активность АЦК дезаминазы, снижая уровень этилена, продлевает вегетационный период растения и способствует взаимовыгодным отношениям. Галотолерантность штамма PK2 обуславливает способность противостоять стрессам, связанным с изменениями солености и водной активности, характерным для филлосферы и ризосферы растений, являясь дополнительным фактором успешного фитосимбиоза. Стимулирующее влияние штамма PK2 на рост растений необходимо подтвердить экспериментально.

В настоящее время разрабатываются подходы для генетической модификации метилотрофов с целью создания штаммов с повышенной выживаемостью в условиях фито-

симбиоза при условиях, когда концентрации выделяемого растениями метанола низки. Способность *M. rotukkalensis* РК2 одновременно усваивать маннит и метанол через независимые пути также способствует его выживаемости в подобных условиях.

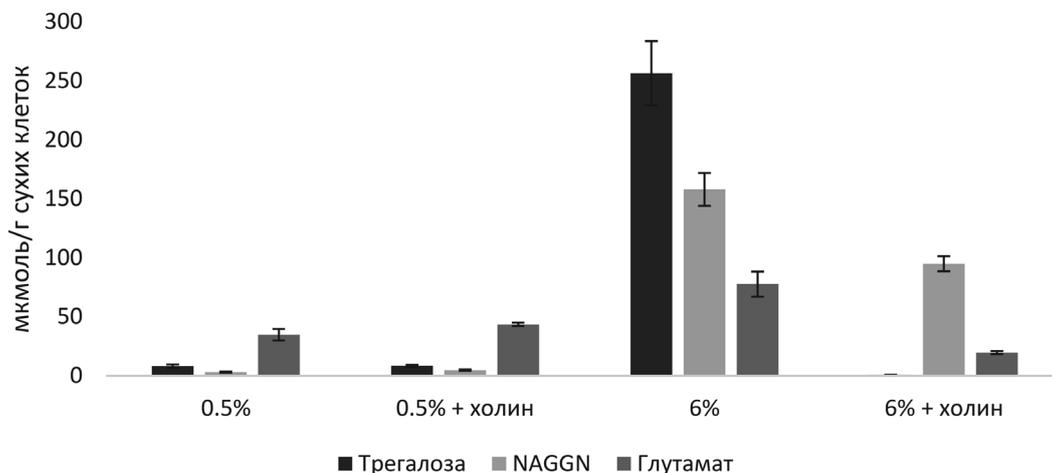


Рис. 1. Влияние холина на спектр осмолитов в клетках штамма РК2

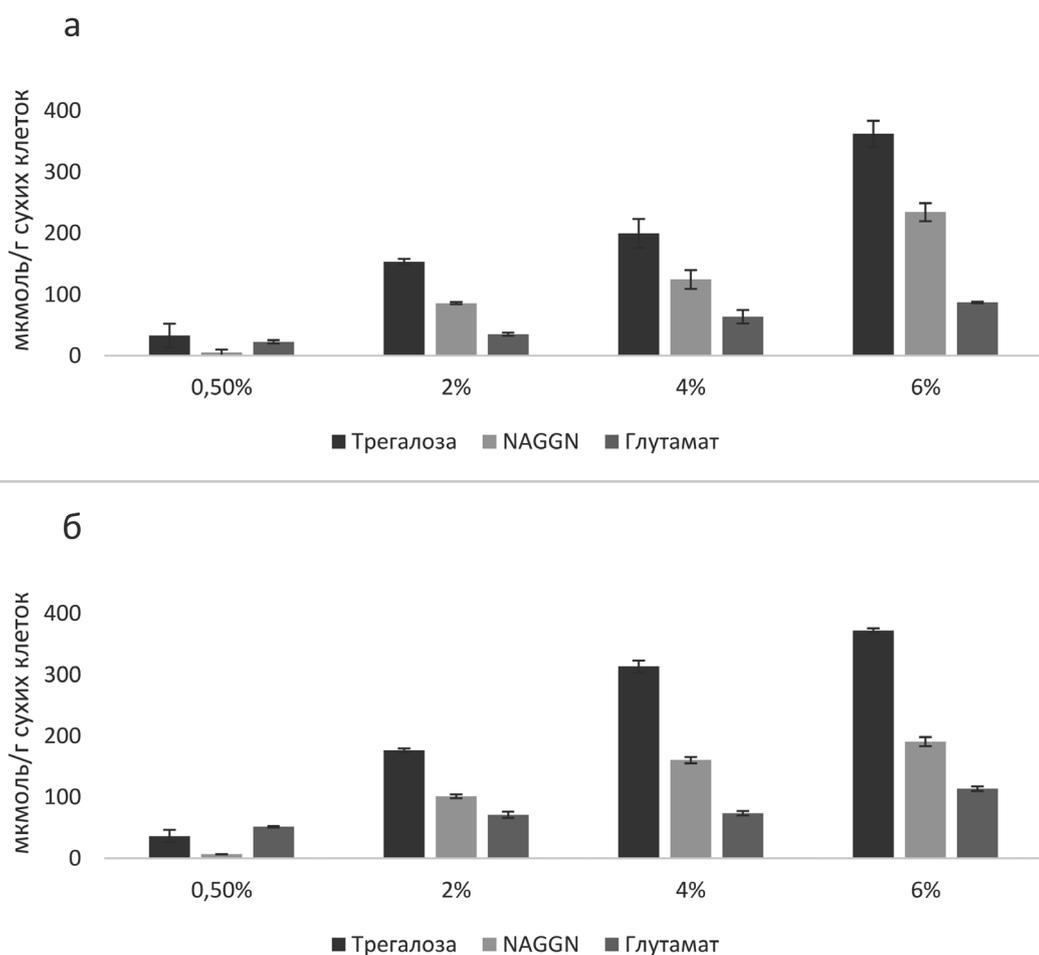


Рис. 2. Влияние ростового субстрата на спектр осмолитов в клетках штамма РК2.  
а – рост РК2 на метаноле; б – рост РК2 на манните

# ДРОЖЖЕВОЕ НАСЕЛЕНИЕ РАЗНЫХ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП МУРАВЬЕВ ВИДА *FORMICA AQUILONIA*

К.П. Меркель<sup>269</sup>

Известно, что дрожжи ассоциированы с различными беспозвоночными животными. Так, например, описаны примеры симбиоза дрожжей с представителями многих отрядов насекомых: жесткокрылых (*Coleoptera*), двукрылых (*Diptera*) и перепончатокрылых (*Hymenoptera*), предполагается, что для их личинок дрожжи являются основным источником пищи. В ходе ряда исследований, выполненных в нашей лаборатории в разные годы (Голубев, Бабьева, 1972; Максимова и др., 2016), было показано, что тесные ассоциации обнаружены между дрожжами семейства *Debaryomycetaceae* и муравьями рода *Formica*. В частности, было показано, что эти дрожжи постоянно присутствуют в материале муравейников *Formica aquilonia*, а также на поверхности самих насекомых, причем в почвах вокруг муравейников или на других сопряженных субстратах эти дрожжи встречаются очень редко или не встречаются вовсе (Максимова и др., 2016).

Муравьи являются насекомыми с полным превращением, и их разные онтогенетические стадии характеризуются различными экологическими особенностями. Так как наибольшее количество дрожжей, в ходе наших предварительных исследований, было обнаружено в камерах с расплодом, мы предположили, что дрожжи необходимы муравьям также в качестве корма личинок. В связи с этим мы решили изучить дрожжевое население представителей разных онтогенетических стадий муравьев и таким образом попытаться выяснить, верна ли наша гипотеза.

В качестве объектов исследования нами были выбраны представители четырех онтогенетических групп *F. aquilonia*, представители которых были отобраны в период с 24 по 31 июля 2023 года в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ (республика Карелия и Мурманская область). Всего нам удалось отобрать 91 особь: личинки – 13, куколки – 33, имаго – 39 особей, алаты (крылатые особи) – 6 особей.

Для изучения дрожжевого населения муравьев мы использовали метод посева на плотную питательную среду – глюкозо-пептонно-дрожжевой агар, в который для подавления роста бактерий был добавлен левомицетин. Для посева мы гомогенизировали муравьев из каждой онтогенетической группы с помощью силиконового пестика и приготовленный гомогенат высевали в трехкратной повторности. Посевы инкубировали в течение 5–7 дней при комнатной температуре, все выросшие колонии

<sup>269</sup> Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

на основании культуральных признаков разделяли на морфотипы, затем проводили учет численности колоний каждого морфотипа и пересчет общего количества колони-еобразующих единиц (КОЕ) и численности каждого из морфотипов на 1 особь. Идентификацию представителей каждого морфотипа дрожжей осуществляли на основании морфологических признаков и анализа нуклеотидных последовательностей региона ITS1-5.8S-ITS2 и D1/D2 домена 26S (LSU) рДНК.

Дрожжи были нами обнаружены у всех онтогенетических групп, кроме группы алатов, однако их численности достоверно различаются. Даже внутри одной онтогенетической группы численности дрожжей могут варьировать в очень широком диапазоне (табл. 1). Дрожжевое население личинок было малочисленным – средние значения составляли не более 2,14 КОЕ/особь, при этом в большинстве образцов дрожжи отсутствовали. Среднее значение численности дрожжей у имаго составило  $2 \cdot 10^2$  КОЕ/особь при медиане в 7,9 КОЕ/особь. Вопреки нашей первоначальной гипотезе максимальные значения численности дрожжей были отмечены на куколках – среднее значение численности составляет  $2,5 \cdot 10^3$  КОЕ/особь при медиане  $3,5 \cdot 10^2$  КОЕ/особь, однако максимальное значение численности дрожжей в этой группе образцов достигает  $1,3 \cdot 10^4$  КОЕ/особь.

Таблица 1.

Встречаемость и численность дрожжей  
у разных онтогенетических групп *F. aquilonia*

Онтогенетическая группа	Встречаемость, %	Min	Mean	Median	Max
Личинки	25	0	2,14	0	8,3
Куколки	100	2,5	$2,6 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^4$
Имаго	75	0	$2 \cdot 10^2$	7,91	$4,2 \cdot 10^3$

Дрожжевое население муравьев *F. aquilonia* представлено всего двумя видами аскомицетов – *Debaryomyces hansenii* и *Schwanniomyces polymorphus* (табл. 2, 3). Как мы уже писали выше, в ранних работах, посвященных дрожжевому населению муравьев *Formica*, преобладали также дебариомицетовые дрожжи. Стоит, однако, отметить, что дрожжевое население муравьев *F. aquilonia* оказалось многочисленнее, чем у родственного ему вида *F. rufa*.

Таблица 2.

Встречаемость и численность дрожжей *D. hansenii*  
у разных онтогенетических групп *F. aquilonia*

Онтогенетическая группа	Встречаемость, %	Min	Mean	Median	Max
Личинки	42,8	0	2,5	0,8	8,3
Куколки	85,7	0	$2,2 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^4$
Имаго	75	0	$1,9 \cdot 10^2$	7,5	$4,2 \cdot 10^3$

Таблица 3.

Встречаемость и численность дрожжей *Schw. polymorphus*  
у разных онтогенетических групп *F. aquilonia*

Онтогенетическая группа	Встречаемость, %	Min	Mean	Median	Max
Личинки	0	0,00	0	0	0
Куколки	21,4	0	4,6 * 10 <sup>2</sup>	0	8,6 * 10 <sup>3</sup>
Имаго	7,1	0	7,4	0	1,6 * 10 <sup>2</sup>

Тем не менее, выявленные нами особенности дрожжевого населения муравьев, относящихся к разным онтогенетическим группам, а именно то, что максимальная численность дрожжей обнаружена нами на стадии, когда муравьи не питаются, позволяют нам сделать предположение о том, что дрожжи являются для муравьев скорее не источником белка, а источником личочных гормонов экдизонов – стероидных гормонов, стимулирующего процессы линьки и метаморфоза у ряда насекомых с полным превращением, без которого метаморфоз становится невозможным. Например, у *Drosophila melanogaster* наибольшее количество экдизонов наблюдается именно на стадии куколки, так же известно, что источником экдизона для них служат дрожжи, в частности, *Saccharomyces cerevisiae* (Харборн, 1985). Косвенным подтверждением данной гипотезы может служить еще и тот факт, что на образцах имаго, в связи с отсутствием у них личочных процессов, дрожжи практически не встречались, а то небольшое количество обнаруженных дрожжей, вероятно может быть связано с недавним выходом данных особей из куколки.

**Список литературы:**

1. Голубев В.И., Бабьева И.П. Дрожжи рода *Debaryomyces* Klöck. В гнездах муравьев группы *Formica rufa* L. // Экология. 1972. – № 1. – С. 78–82.
2. Максимова, И.А., Глушакова, А.М., Качалкин, А.В., Чернов, И.Ю., Пантелеева, С.Н., Резникова, Ж.И. Дрожжевые сообщества муравейников *Formica aquilonia* //Микробиология. – 2016. – Т. 85. – №. 1. – С. 100–106.
3. Харборн Д. Б. Введение в экологическую биохимию. М.: Мир. 1985, 311 с.

# ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *SOLANUM MELONGENA* L.

Л.Д.Н. Муршеди<sup>270</sup>, И.П. Соляникова<sup>271</sup>

Наночастицы серебра характеризуются способностью ингибировать развитие вирусов, паразитов и бактерий, поэтому они находят все более широкое применение в качестве антибиотических компонентов при лечении многих заболеваний, таких как синдром поликистозных яичников у женщин, заболеваниях мочевого пузыря и некоторых видах онкологии (1,2). Показана эффективность применения наночастиц для лечения ран и царапин человека благодаря высокой активности и эффективности в отношении микробов, даже при применении в низких концентрациях. Наночастицы серебра характеризуются широкой доступностью, низкой себестоимостью и экономической эффективностью (3). Производство считается экологически чистым, поскольку не вызывает каких-либо загрязнений окружающей среды или экологических проблем. Одним из достоинств наночастиц серебра является низкая токсичность для людей (4).

В последнее время развивается технология зеленого синтеза наночастиц на основе различных природных компонентов. В целом технология зеленого синтеза является экономически недорогой и менее токсичной для людей. В своей работе мы впервые использовали экстракт мякоти баклажан для зеленого синтеза наночастиц серебра. В данной работе представлены данные по оценке бактерицидной активности наночастиц серебра, полученных на основе экстракта баклажан, в отношении четырех видов микроорганизмов, а именно грамположительных *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* и грамотрицательных *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Для проверки антимикробной активности, клетки бактерий выращивали в жидкой питательной среде до оптической плотности 1 О.Е. при длине волны 600 нм, 100 мкл клеточной суспензии наносили на заранее приготовленную агаризованную среду ЛБ, в которой сверлом пробивали колодцы диаметром 5 мм. В колодцы вносили по 100 мкл суспензии наночастиц коллоидного серебра при трех различных концентрациях: 50, 100, 200 ppm. В качестве контроля использовали 100 мкл экстракта мякоти баклажан, использованных для получения наночастиц. Инкубирование проводили

<sup>270</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, 308015

<sup>271</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, 308015

в течение 24 ч при 30 °С, после чего оценивали зону подавления роста бактериальных культур. Анализ полученных результатов показал, что наиболее эффективным было воздействие наночастиц с концентрацией 200 ppm. Ингибирующий эффект наблюдался по отношению ко всем протестированным микроорганизмам. Стоит отметить, что наиболее чувствительными к действию наночастиц серебра, полученных зеленым синтезом, оказалась культура клеток *E. coli*. Зона ингибирования роста составляла 27 мм, в то время как в контроле, экстракт мякоти баклажан, зона ингибирования не превышала 2 мм.

Наночастицы серебра, в том числе полученные методом зеленого синтеза, широко используются в медицинских антимикробных препаратах, средствах личной гигиены, строительных материалах, для очистки воды и медицинских инструментах (5–7). В последние годы выросло их значение для сельскохозяйственного сектора, благодаря выраженному положительному эффекту на рост и размножение растений (8). В данной работе мы показали эффективное подавление роста и развития популяции патогенных и условно-патогенных бактерий при использовании наночастиц серебра, полученных методом зеленого синтеза на основе экстракта баклажан.

### Reference:

1. Liu, X., Shan, K., Shao, X., Shi, X., He, Y., Liu, Z., Jacob, J. A., & Deng, L. (2021). Nanotoxic effects of silver nanoparticles on normal HEK-293 cells in comparison to cancerous hela cell line. *International Journal of Nanomedicine*, 16. <https://doi.org/10.2147/IJN.S289008>
2. Kanniah, P., Radhamani, J., Chelliah, P., Muthusamy, N., Joshua Jebasingh Sathiya Balasingh, E., Reeta Thangapandi, J., Balakrishnan, S., & Shanmugam, R. (2020). Green Synthesis of Multifaceted Silver Nanoparticles Using the Flower Extract of *Aerva lanata* and Evaluation of Its Biological and Environmental Applications. *ChemistrySelect*, 5(7). <https://doi.org/10.1002/slct.201903228>
3. Kalantari, K., Mostafavi, E., Afifi, A. M., Izadiyan, Z., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: Promises and pitfalls. In *Nanoscale* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.1039/c9nr08234d>
4. Shafey, A. M. el. (2020). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. In *Green Processing and Synthesis* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0031>
5. Chen, X., and Schluesener, H. (2008). Nanosilver : nano product in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1). PP 1–12.
6. Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., & Patil, S. v. (2014). Plant extract: A promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 173, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0831-4>
7. Castro-González, C. G., Sánchez-Segura, L., Gómez-Merino, F. C., & Bello-Bello, J. J. (2019). Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: transport and accumulation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46828-y>
8. Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., & Theerakulpisut, P. (2017). Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>.

# ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ НА МИКРОБИОТУ ПОЧВЫ

Н.И. Наумович<sup>272</sup>, В.И. Пригодская<sup>273</sup>

Активное использование месторождений калийных солей (ОАО «Беларуськалий») привело к накоплению более полумиллиона тонн твердых глинисто-солевых шламов на площади свыше тысячи гектаров. Вследствие газопылевыбросов обогатительных фабрик и ветровой эрозии глинисто-солевых шламов загрязнение окружающей среды распространяется на территории, находящиеся в непосредственной близости от ОАО «Беларуськалий». Выбросы обогатительных фабрик загрязняют верхний корнеобитаемый слой почвы солями и тяжелыми металлами. Засоление почвы сопровождается негативным влиянием на почвенный микробиом и в том числе на агрономически ценные группы микроорганизмов, что приводит к уменьшению биогенности почвы и усугубляет рост и развитие растений [1, 2].

Целью работы – изучить влияние длительного техногенного засоления на численность микроорганизмов различных эколого-трофических групп.

Определение плотности популяции агрономически ценных групп микроорганизмов в почвенных образцах, определяли методом предельных разведений с последующим высевом почвенной суспензии на соответствующие плотные питательные среды [3].

Количественную оценку обилия *nifH*-гена в почвенных образцах проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени на приборе Agilent Mx3005P. Для выявления фрагментов *nifH*-гена использовали праймеры *nifH-F* и *nifH-R* [4].

Исследования образцов проводились на трех участках засоленной почвы: основания терриконов (MicSt1, MicSt2, MicSt3), через 150 (MicSt7, MicSt8, MicSt9) и 250 метров (MicSt13, MicSt14, MicSt15) от основания терриконов, расположенных в районе складирования отходов Старобинского месторождения калийных солей (ОАО «Беларуськалий»), содержащих хлорид натрия в концентрации от 0,13–3,4 %.

Изучение влияния отходов ОАО «Беларуськалий», содержащих технический хлористый натрий (галит), на микробиологическую активность почвы, свидетельствовало о негативном воздействии длительного засоления на агрономически ценные группы микроорганизмов (табл. 1).

Установлено, что повышенная концентрация хлорида натрия негативно влияет на численность микроорганизмов в исследуемых образцах почв. Популяция не-

<sup>272</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>273</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Таблица 1.

## Влияние засоления на микробиоту почвы

Вариант опыта	Численность бактерий в почвенных образцах, КОЕ / г а.с.п.				
	неспорообразующие аммонификаторы	спорообразующие аммонификаторы	усваивающие минеральные формы азота	олигонитро-фильные, в т.ч. азотфиксирующие	фосфатсольюбилизующие
MicSt1	$(3,27 \pm 0,33) \times 10^5$	$(1,09 \pm 0,25) \times 10^4$	$(7,71 \pm 0,26) \times 10^5$	$(3,35 \pm 0,32) \times 10^5$	$(9,89 \pm 0,26) \times 10^5$
MicSt2	$(4,76 \pm 0,25) \times 10^5$	$(1,51 \pm 0,25) \times 10^4$	$(9,23 \pm 0,38) \times 10^5$	$(3,39 \pm 0,44) \times 10^5$	$(8,14 \pm 0,31) \times 10^5$
MicSt3	$(4,69 \pm 0,12) \times 10^5$	$(1,92 \pm 0,12) \times 10^4$	$(9,53 \pm 0,19) \times 10^5$	$(3,13 \pm 0,18) \times 10^5$	$(9,10 \pm 0,43) \times 10^5$
MicSt7	$(5,64 \pm 0,19) \times 10^6$	$(3,17 \pm 0,24) \times 10^5$	$(4,65 \pm 0,12) \times 10^6$	$(8,60 \pm 0,25) \times 10^6$	$(3,81 \pm 0,12) \times 10^6$
MicSt8	$(6,50 \pm 0,12) \times 10^6$	$(2,73 \pm 0,12) \times 10^5$	$(5,45 \pm 0,13) \times 10^6$	$(9,36 \pm 0,31) \times 10^6$	$(3,98 \pm 0,12) \times 10^6$
MicSt9	$(4,22 \pm 1,28) \times 10^6$	$(3,71 \pm 0,20) \times 10^5$	$(6,00 \pm 0,14) \times 10^6$	$(9,86 \pm 0,61) \times 10^6$	$(3,26 \pm 0,20) \times 10^6$
MicSt13	$(5,05 \pm 0,32) \times 10^7$	$(2,45 \pm 0,13) \times 10^5$	$(7,43 \pm 0,19) \times 10^7$	$(1,20 \pm 0,05) \times 10^8$	$(1,11 \pm 0,03) \times 10^7$
MicSt14	$(4,94 \pm 0,26) \times 10^7$	$(2,92 \pm 0,14) \times 10^5$	$(7,18 \pm 0,13) \times 10^7$	$(1,12 \pm 0,03) \times 10^8$	$(1,16 \pm 0,02) \times 10^7$
MicSt15	$(4,96 \pm 0,25) \times 10^7$	$(1,68 \pm 0,12) \times 10^5$	$(7,75 \pm 0,12) \times 10^7$	$(1,28 \pm 0,03) \times 10^8$	$(1,15 \pm 0,01) \times 10^7$
Контроль	$(7,38 \pm 0,45) \times 10^8$	$(1,20 \pm 0,19) \times 10^6$	$(2,90 \pm 0,19) \times 10^8$	$(4,85 \pm 0,32) \times 10^8$	$(2,90 \pm 0,20) \times 10^8$

спорообразующих аммонифицирующих микроорганизмов в составе микробиоты в опытных вариантах MicSt1, MicSt2, MicSt3 была ниже чем в контроле на три порядка и находилась в диапазоне  $(3,27 \pm 0,33) \times 10^5$  –  $(4,76 \pm 0,25) \times 10^5$  КОЕ / г а.с.п., а в вариантах MicSt7, MicSt8, MicSt9 снижена на 2 порядка и выявлялось на уровне  $(4,22 \pm 1,28) \times 10^6$  –  $(6,50 \pm 0,12) \times 10^6$  КОЕ / г а.с.п. Выявлено, что содержания данной группы микроорганизмов в вариантах опыта MicSt13, MicSt14, MicSt15 было меньше чем в контроле на порядок и составила  $(4,94 \pm 0,26) \times 10^7$  –  $(5,05 \pm 0,32) \times 10^7$  КОЕ / г а.с.п.

Содержание спорообразующих аммонифицирующих микроорганизмов в почвенных образцах MicSt1, MicSt2, MicSt3, MicSt7, MicSt8, MicSt9, MicSt13, MicSt14, MicSt15 уменьшилось с  $(1,68 \pm 0,12) \times 10^5$  до  $(1,09 \pm 0,25) \times 10^4$  КОЕ / г а.с.п. по сравнению с контролем. Количество бактерий, усваивающих минеральные формы азота в составе микробиоты почвы MicSt1, MicSt2, MicSt3, MicSt7, MicSt8, MicSt9, MicSt13, MicSt14, MicSt15 было меньше чем в контроле и варьировало в пределах от  $(7,71 \pm 0,26) \times 10^5$  до  $(7,75 \pm 0,12) \times 10^7$  КОЕ / г а.с.п.

Численность олигонитрофильных, в том числе азотфиксирующих микроорганизмов в составе микробиоты в почвенных образцах MicSt1, MicSt2, MicSt3 была ниже на 3 порядка чем в контроле и варьировало в пределах от  $(3,13 \pm 0,18) \times 10^5$  до  $(3,39 \pm 0,44) \times 10^5$  КОЕ / г а.с.п., а в образцах почвы MicSt7, MicSt8, MicSt9 – от  $(8,60 \pm 0,25) \times 10^6$  до  $(9,86 \pm 0,61) \times 10^6$  КОЕ / г а.с.п. В вариантах опыта MicSt13, MicSt14, MicSt15 отмечается уменьшение численности популяции олигонитрофилов, в том числе азотфиксаторов по сравнению с контролем от до  $(1,20 \pm 0,05) \times 10^8$  –  $(1,28 \pm 0,03) \times 10^8$  КОЕ / г а.с.п., что меньше чем в контроле в 100 раз. Количество фос-

фатсоллюбилизирующих микроорганизмов в составе микробиоты почвы MicSt1, MicSt2, MicSt3, MicSt7, MicSt8, MicSt9, MicSt13, MicSt14, MicSt15 уменьшилось по сравнению с контролем в 1000, 100 и 10 раз и находилось в диапазоне от  $(9,89 \pm 0,26) \times 10^5$  до  $(1,15 \pm 0,01) \times 10^7$  КОЕ / г а.с.п.

Анализ обилия гена нитрогеназы *nifH* в исследуемых образцах почвы, выявил, что в образце почвы MicSt1, содержащего хлорид натрия в количестве 3,41 %, копии *nifH* гена обнаруживаются в количестве  $2,5 \times 10^3$  копий/г почвы. В почвенных образцах MicSt2 и MicSt3 с концентрацией хлорида натрия 2,48 и 2,12 %, соответственно, выявлено  $2,6 \times 10^4$  и  $3,7 \times 10^4$  копий/г почвы соответственно. Концентрация нитрогеназы в почвенных образцах MicSt7, MicSt8 и MicSt9, содержащих NaCl от 0,25 до 0,68 %, находилась в диапазоне  $1,15 - 1,50 \times 10^5$  копий/г почвы. Количество копий *nifH* гена в образцах почвы MicSt13, MicSt14 и MicSt15 составило  $2,2 \times 10^5$ ,  $2,4 \times 10^5$  и  $2,5 \times 10^5$  копий/г почвы. Наиболее богатая генами *nifH* оказалась контрольная почва (Cn), содержащая хлорид натрия в концентрации 0,034 %, концентрация данного гена равнялась  $5,0 \times 10^5$  копий/г почвы.

Результаты изучения обилия гена нитрогеназы *nifH* микробиоты в образцах почв, подвергавшихся длительному техногенному засолению и почв, свидетельствует о снижении численности азотфиксирующих микроорганизмов в образцах почв, содержащих хлорид натрия в концентрации 3,41 % по сравнению с образцами почв не подвергавшимся антропогенному воздействию и содержащих хлорид натрия в концентрации 0,034 %.

### Список литературы:

1. Леонтьева, Т.Г. Использование глинисто-солевых шламов ОАО «Беларуськалий» для получения сорбентов радионуклидов / Т.Г. Леонтьева, Л.Н. Москальчук // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века : материалы 17-й междунар. науч. конф., Минск, 18–19 мая 2017 г. : в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т Белорус. гос. ун-та ; под общ. ред. С.А. Маскевича, С.С. Позняка. – Минск, 2017. – Ч. 2. – С. 147–148.
2. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Першина [и др.] // Экол. генетика. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 32–39.
3. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги ; пер. с венг. И.Ф. Куренного ; под ред. Г.С. Муромцева. – М. : Колос, 1983. – 296 с.
4. Прокариотный компонент нефтезагрязненной торфяной олиготрофной почвы при разном уровне минерального питания / Н. А. Манучарова [и др.] // Почвоведение. – 2021. – №1. – с. 80–89. DOI: 10.31857/S0032180X2101010X.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б23МС-003).*

# ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СЛОЖНОРАСТВОРИМЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА ПОЧВУ

А.И. Нечаева<sup>274</sup>, В.Ю. Сенченков<sup>275</sup>, И.П. Соляникова<sup>276</sup>

Продукты нефтепереработки применяются в разных сферах промышленности, например: в качестве топлива, в медицинских и фармацевтических областях. В то же время, продукты и отходы таких производств загрязняют окружающую среду, это возможно из-за добычи и транспортировки нефти, сжигания и промышленных отходов и остаточных нефтепродуктов.

Дизельное топливо является одним из наиболее частых загрязнителей, так как его используют практически во всех видах транспорта, в металлургии, кожевенном производстве и т.д. По своему составу, дизельное топливо является смесью сложных углеводородов, поэтому оно не испаряется, а впитывается в почву и образует пленку, которая не позволяет осуществляться газообменным процессам. Помимо этого, проявляется фитотоксическое влияние на растения, так как страдают генеративная и вегетативная системы.

Непосредственно компоненты дизельного топлива при попадании в почву изменяют ее физико-химические свойства, а это негативно влияет на биоразнообразие. Микробиом почвы тоже страдает от таких изменений среды, нарушаются процессы биодеградации и круговорот питательных веществ. Для снижения вредного воздействия дизельного топлива на почву применяются различные методы ремедиации. Однако успешность этих методов зависит от множества факторов, включая тип почвы, климатические условия и концентрацию загрязняющих веществ. Одним из перспективных методов ремедиации почв от загрязнений нефтепродуктами, в том числе дизельного топлива, является микробиологическая биоремедиация. [1]

Микроорганизмы играют важную роль в биоремедиации почв благодаря своим способностям разлагать и трансформировать различные загрязнители. Их использование в экологических технологиях позволяет восстановить загрязнённые почвы, улучшая их качество и снижая токсичность. [2] Дальнейшие исследования в этой области способствуют разработке более эффективных методов очистки и восстановления экосистем.

Повышение эффективности микробиологической ремедиации загрязненных почв достигается за счет внесения в почву микробных биопрепаратов, в составе которых находятся микроорганизмы, обладающие биодеструкторной активностью, при этом –

<sup>274</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

<sup>275</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

<sup>276</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

как в качестве отдельного компонента, так и в составе комплексного органоминерального удобрения, повышающего плодородие почвы и содержащего источники азота, фосфора и других макро- и микроэлементов. Таким образом, почва не только будет восстанавливаться, но и улучшать свои физико-механические и физико-химические свойства.

Так, известно применение различных препаратов, содержащих в своем составе помимо ряда вспомогательных веществ микроорганизмов-поллютантов и биодеструкторов сложных углеводородных соединений, среди которых – «Путидойл», «Экойл», «АВАЛОН» и другие имеют доказанную активность. [3]

Технологии микробиологической биоремедиации совершенствуются с каждым детальным изучением данного вопроса, в том числе и поиском эффективных природных штаммов, которые характеризуются большей эффективностью и меньшей требовательностью к условиям среды.

Целью настоящей работы была оценка влияния сложнорастворимых загрязнителей, присутствующих в почве, на прорастание семян. Из образца почвы было выделено 45 культур микроорганизмов, из которых 13 могут использовать дизельное топливо (ДТ) в качестве источника углерода. Выращивали данные культуры на минеральной среде с добавлением дизельного топлива в количестве 1% от объема среды. ДТ вносили в почву в количестве 5% (w/w) и перемешивали с почвой до однородного состояния. Бактериальную суспензию для обработки почв готовили путем смешения суспензий каждой культур бактерий, выращенных до 1,5 о.е. (600 нм), по 1 мл каждой. В образцы стерильной и нестерильной почв вносили полученную смесь по 13 мл, и снова перемешивали почву.

Схема эксперимента включала:

- 1) контроль
- 2) стерильная почва + дизельное топливо (ДТ)
- 3) стерильная почва + ДТ + бактериальная суспензия (БС)
- 4) нестерильная почва + ДТ
- 5) нестерильная почва + ДТ + БС

После этого все 5 образцов были накрыты пищевой пленкой для предотвращения высыхания и помещены на выдержку при комнатной температуре в течение 1 месяца, каждый день увлажняя почву питьевой водой комнатной температуры.

По истечению 1 месяца в данные контейнеры была посеяна пшеница в количестве 50 семян в каждый лоток. Оценку влияния сложнорастворимых загрязнителей проводили на основании полученных значений прорастания семян пшеницы и общей токсичности почвы с использованием рекомендаций ФР. 1.39.2007.03223 [4].

В результате выявлено, что почва с внесенным в количестве 5% (вес/вес) ДТ характеризовалась как слабое загрязнение на протяжении всего эксперимента. Показатели роста пшеницы на почве, пропитанной ДТ, составили 32% и 34% со стерильной и нестерильной почвой соответственно, в то время как показатели роста на почве, обрабо-

танной ДТ и БС составили 86% и 88% соответственно. В контрольном образце – 82%. Таким образом, внесение бактериальной суспензии в почвы, содержащие дизельное топливо, значительно способствовало прорастанию семян по сравнению с образцами почв, которые не обрабатывались бактериальной смесью. В то же время, полученные значения были незначительно выше контроля – нативной почвы.

Полученные данные позволяют предположить, что данные микроорганизмы могут играть одну из важных экологических ролей в очистке окружающей среды, являясь биодеструкторами сложнорастворимых соединений, особенно – нефтепродуктов.

На данный момент проводится интерпретация полученных результатов микробиологических и молекулярно-генетических исследований, также проводятся определения индивидуальных биохимических и физиологических особенностей выделенных штаммов. Планируются дальнейшие исследования возможностей применения данных культур в качестве перспективных биодеструкторов сложнорастворимых поллютантов, применяемых в различных сферах промышленности и сельского хозяйства.

#### **Список литературы:**

1. Bhatnagar S., Kumari R. Bioremediation: a sustainable tool for environmental management—a review // *Annual Research & Review in Biology*. – 2013. – Т. 3. – №. 4. – С. 974–993.
2. Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // *Microbiological reviews*. – 1990. – Т. 54. – №. 3. – С. 305–315.
3. И.Д. Созина, А.С. Данилов Микробиологическая ремедиация нефтезагрязненных почв // *Записки Горного института*. 2023. №260. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskaya-remediatsiya-neftezagryaznennyh-pochv>.
4. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей ФР 1.39.2007.03223.[Электронный ресурс]: <https://gostrf.com/normadata/1/4293842/4293842245.pdf>.

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ РАЗНОГО СОСТАВА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI*

Е.А. Образцова<sup>277, 278</sup>, Е.В. Сорокина<sup>279</sup>

Исследование взаимодействия наночастиц различной природы с биологическими объектами вызывает повышенный интерес, вызванный началом широкого применения нанобъектов в продуктах массового и промышленного потребления. Однако воздействие используемых наноматериалов на биологические системы, в том числе и на человека, изучено недостаточно. Воздействие углеродных нанотрубок (УНТ) на бактериальные культуры может привести к их гибели. Ранее в исследованиях было показано, что УНТ могут проникать в клетки бактерий и вызывать их повреждение и гибель. Это может быть связано с тем, что поверхность УНТ может взаимодействовать с клеточными мембранами бактерий, вызывая их разрушение. Кроме того, некоторые исследования показывают, что УНТ также могут вызывать изменения в метаболизме бактерий и приводить к их гибели.

Однако, необходимо отметить, что не все исследования подтверждают негативное воздействие УНТ на бактерии. Некоторые исследования показали, что УНТ могут быть использованы для создания новых материалов, которые могут помочь в борьбе с бактериальными инфекциями. Например, УНТ могут использоваться для создания антибактериальных покрытий, которые могут предотвращать рост бактерий на поверхности материалов [1-3].

Таким образом, хотя воздействие УНТ на бактериальные культуры может приводить к их повреждению и гибели, существует возможность использования этих наночастиц для создания новых антибактериальных материалов. Однако, необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, как УНТ воздействуют на различные типы бактерий и какие эффекты могут быть вызваны их использованием в медицине.

В данной работе было исследовано влияние на бактериальные клетки двух видов нанотрубок – из углерода и нитрида бора. Также был проведен сравнительный анализ воздействия, оказываемого такими материалами и наночастицами с аналогичным составом, но отличными по структуре – наночастиц алмаза, графита и их аналогов из нитрида бора – в кубической и гексагональной форме.

<sup>277</sup> Институт Биоорганической химии имени ак. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва

<sup>278</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, 141701, г. Долгопрудный

<sup>279</sup> Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва

Исследование морфологии клеток бактериального биотеста с созданным светящимся фенотипом до и после взаимодействия с наночастицами было проведено методом сканирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа Zeiss Merlin. Для проведения измерений бактериальные клетки наносились на чистые кремниевые подложки. Оценка первичной интегральной токсичности проводилась с помощью бактериального люминесцентного теста на бактериях *Escherichia coli* K12 TGI с созданным светящимся фенотипом (биосенсор «Эколюм») [4].

Анализируя концентрации, исследуемых наночастиц на их биологическую активность, можно выделить зоны концентраций, где каждый вид наночастиц был нетоксичен, токсичен или очень токсичен. Частицы алмаза, графита, кубического и гексагонального нитрида бора в диапазоне концентраций до 165 мкг/мл были нетоксичны, индекс токсичности на протяжении 36 часов регистрировали в пределах значений от -28 до 20. Многие авторы принимают показатели стимуляции люминесценции биотеста как токсическое действие ксенобиотиков незначимым. [5]. Некоторые связывают стимуляцию люминесценции светящихся бактерий с механизмом действия веществ высокой липофильности, в то время как гидрофильные вещества преимущественно вызывают эффект тушения люминесценции. При этом стимуляция и ингибирование свечения бактерий является показателем проявления биологической активности [6]. В то же время, при инкубировании с нанотрубками из углерода нитрида бора регистрировали значения  $T \sim 58$  и  $T \sim 49$  соответственно, что свидетельствует о токсичности данных материалов.

На сегодняшний день используются различные подходы для оценки токсичности веществ, негативное действие которых может проявляться отдаленно во времени. Эти вещества способны нарушать метаболические процессы, протекающие в клетке и влиять на репродукцию клеток. В нашей работе мы также проанализировали прирост биомассы *E. coli* на среде LB с помощью мониторинга ОП при 560 нм и дополнительно регистрировали показатель КОЕ. Исследование кривой роста бактерий после инкубации с наночастицами позволило оценить истинное значение токсичности и биологическую активность исследуемых веществ.

Таким образом, на основании данных биолюминесценции и растровой электронной микроскопии показано, что в зависимости от внутренней структуры наночастицы с одинаковым составом по-разному влияют на бактериальные клетки. Алмазо- и графитоподобные материалы не являются токсичными для бактериальных клеток, не оказывают повреждающее действие в отличие от углеродных и нитрид борных нанотрубок.

Полученные результаты показывают также, что безопасность наночастиц зависит не только от состава, но от их внутренней структуры. Это означает, что нет однозначно вредных или полезных наноматериалов, а только безопасные или токсичные количества, которые попадают в организм. Биологическое тестирование с помощью биотестов на основе микроорганизмов помогает определить, какие наночастицы и при каких

условиях безопасны, что позволяет разработать нормы и условия для безопасного применения данных наноматериалов.

### **Список литературы:**

1. Wu Y., Jelezko F., Plenio M., Weil T. Diamond Quantum Devices in Biology Angewandte Chemie International Edition. 2016. V. 55. P.6586–6598
2. Meng F., Wang H., Huang F., et al. Graphene-based microwave absorbing composites: A review and prospective. Composites Part B. 2018. V. 137. P. 260–277262.
3. Pete Scala E. A Brief History of Composites in the U.S.-The Dream and the Success. Journal of the Minerals. 1996. V. 48. P. 45–48.
4. Зарубина А. П. Сорокина Е. В. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода. Успехи современной биологии. 2017. Т.137, № 6, С. 613–620.
5. Зарубина А.П., Сорокина Е.В., Пархоменко И.М., Гапочка М.Г. Действие нейромедиаторов в условиях искусственного электромагнитного загрязнения среды. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. № 6, С. 20–30.
6. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М. Наука 2009. – 246 с.

*Работа была выполнена в рамках государственного задания  
124031200002-3 и FSMG-2023-0015.*

# ВЛИЯНИЕ НИТРАТА И НИТРИТА НА АНАЭРОБНОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ФОСФОРА ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ЛАБОРАТОРНОГО БИОРЕАКТОРА

А.В. Пелевина<sup>280</sup>, А.Г. Дорофеев<sup>281</sup>, Е.В. Груздев<sup>282</sup>,  
А.В. Марданов<sup>283</sup>, Н.В. Пименов<sup>284</sup>

Биологическое удаление фосфора – процесс, применяемый во всем мире для удаления фосфора из сточных вод на очистных сооружениях. Этот процесс осуществляют фосфат-аккумулирующие организмы (ФАО) – микроорганизмы, способные запасать фосфор сверх необходимого им для роста количества в виде полифосфата. Представители ФАО относятся к микроорганизмам, обладающим циклическим типом метаболизма [1]. В анаэробных условиях (без акцепторов электронов) они поглощают органические соединения (главным образом, летучие жирные кислоты (ЛЖК)) и запасают их в форме внутриклеточных полимеров (поли- $\beta$ -гидроксиалканоатов) с одновременной дегградацией внутриклеточных полифосфатов и выбросом ортофосфата из клеток. В аэробных условиях или при наличии альтернативного акцептора электронов (нитратов или нитритов) ФАО способны расти, поглощать ортофосфаты и синтезировать внутриклеточные полифосфаты, используя для этих процессов энергию от разложения внутриклеточных источников углерода и энергии, накопленных в анаэробных условиях. Использование вместо кислорода нитрата или нитрита в качестве акцептора электронов позволяет значительно улучшить экономические показатели биотехнологии – снизить интенсивность аэрации на 30 % и потребность в углероде на 50 %, а также уменьшить образование ила на 50 % [2].

Целью исследования было проверить возможность использования нитрата или нитрита в качестве акцепторов электронов фосфат-аккумулирующим микробным сообществом, сложившимся в циклических анаэробно/аэробных условиях для поглощения ацетата и дегградации внутриклеточного полифосфата и выброса ортофосфата в среду.

<sup>280</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

<sup>281</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

<sup>282</sup> ФИЦ биотехнологии РАН, Институт биоинженерии РАН им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>283</sup> ФИЦ биотехнологии РАН, Институт биоинженерии РАН им. К.Г. Скрябина, Москва, Россия

<sup>284</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

Было использовано микробное сообщество, обогащенное ФАО, полученное при длительном культивировании (более 1 года) в 6-часовом анаэробно/аэробном цикле в лабораторном реакторе последовательно-периодического типа. Микробное сообщество было стабильно по таксономическому составу и эффективно удаляло фосфор из среды. На основе анализа последовательностей V3-V4 региона гена 16S рРНК доминирующими организмами были ФАО – *Ca. Accumulibacter*, доля которых составляла 29%. Проведенный анализ собранных из метагеномных данных геномов *Ca. Accumulibacter*, наряду с генами ключевых метаболических путей, характерных для ФАО, выявил набор генов необходимых для осуществления процессов денитрификации (*narAB*, *nirS*, *norBC*, *nosZ*) и гены пути диссимиляторной нитрат редукции (*narGHI*, *narAB*, *nirBD*) [3], которые обуславливали возможность использовать нитрат/нитрит в качестве альтернативы кислороду в качестве акцептора электронов.

Влияние нитрата исследовали при культивировании ФАО-сообщества в последовательно-периодическом биореакторе, в котором аэробная фаза цикла была заменена аноксидной. Использование нитрата приводило к потере ФАО-фенотипа – отсутствию высвобождения/потребления фосфата в анаэробно/аноксидном цикле.

В острых опытах было изучено влияние нитрита на цикл выделение/поглощение фосфата. В анаэробный период цикла при добавлении субстрата (ацетата) происходил выброс фосфата в среду, добавление нитрита приводило к снижению концентрации фосфата в среде. Однако скорость его поглощения и количество потребленного фосфора было существенно ниже, чем в стандартных анаэробно/аэробных условиях, когда в качестве акцептора электронов использовался кислород. Потребление нитрита сопровождалось снижением концентрации фосфата в среде. Полное потребление нитрита приводило к прекращению потребления фосфата, однако дополнительное внесение нитрита не приводило к дальнейшему потреблению фосфата.

Таким образом, несмотря на наличие в геномах *Ca. Accumulibacter* генов путей азотного метаболизма, нитрат не может использоваться этими организмами. Нитрит может использоваться ФАО как альтернативный акцептор электронов, однако эффективность удаления фосфора в этих условиях существенно ниже.

### Список литературы:

1. Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В. Циклический метаболизм как способ существования микроорганизмов // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 4. – С. 1–16.
2. Kuba T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system // Water research. – 1996. – Т. 30. – №. 7. – С. 1702–1710.
3. Pelevina A., Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., Beletsky A., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – Art. No. 1297694. doi: 10.3389/fmicb.2023.1297694

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 21-64-00019.*

# ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ АНАЭРОБНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЛЕЧЕБНЫХ ГРЯЗЕЙ ОЗЕРА ТАМБУКАН

В.А. Пихтерева<sup>285, 286</sup>, А.А. Ключкина<sup>287</sup>, А.Ю. Меркель<sup>288</sup>, Д.Г. Заварзина<sup>289</sup>

Бессточное соленое озеро Тамбукан, расположенное в 12 км к юго-востоку от г. Пятигорска (Ставропольский край), является источником уникальных лечебных грязей, широко применяемых в бальнеологии. Питание озера обеспечивается преимущественно атмосферными осадками, химический состав воды соответствует хлоридно-сульфатно-магниевому-натриевому типу (Бондарева, Деркачева, 2017). Формирование лечебных грязей обусловлено биогеохимическими процессами – показано, что микроорганизмы играют решающую роль в преобразовании органического вещества и глинистого материала в составляющие коллоидного комплекса лечебной грязи (Бондарева, Деркачева, 2017). Первые микробиологические исследования вод и донных отложений Тамбуканского озера проводились в начале XX века А.С. Скориковым, Е.Н. Балахонцевым и Б.Л. Исаченко. В ходе работ (1908–1909 гг.; 1911–1915 гг.) были выделены и определены микроорганизмы и процессы, играющие ключевую роль в грязеобразовании (Балахонцев, 1909; Исаченко, 1951). Б.Л. Исаченко обнаружил в Тамбуканской грязи сульфатредуцирующих бактерий и установил их решающее значение в грязеобразовании. Дальнейшие микробиологические исследования ограничивались поиском в образцах грязей патогенной микрофлоры (Мальчуковский и др., 2012), а молекулярные исследования, позволяющие определить таксономический состав микрофлоры лечебных грязей методом высокочувствительного секвенирования участка гена 16S рРНК до сих пор не проводились.

Целью работы является изучение таксономического и функционального состава анаэробных микробных сообществ лечебных грязей озера Тамбукан методами накопительных культур и филогенетического профилирования.

Добыча грязей проводится с баржи илочерпательной машиной, которая отбирает ил, чёрную и тёмно-серую грязи, представляющих наибольшую бальнеологическую ценность. В качестве объекта исследования были использованы две пробы грязей,

<sup>285</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

<sup>286</sup> E-mail: pikhtereva.valeria@gmail.com

<sup>287</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

<sup>288</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

<sup>289</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

отобранные с баржи: окисленная (поверхность) и восстановленная (глубина 10 см). Образцы были использованы для анализа состава микробные сообщества методом высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S РНК и для получения накопительных культур ключевых метаболических групп анаэробных микроорганизмов на минеральной среде, идентичной по катионно-анионному составу воде озера. В качестве доноров электронов использовали молекулярный водород (10%), ацетат (10 мМ), лактат (10 мМ), глюкозу (1 г/л) и дрожжевой экстракт (1 г/л), пирротин (FeS) и углекислый газ (90%). В качестве акцепторов электронов использовали сульфат и синтезированный ферригидрит ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Инкубирование проводили в темноте при комнатной температуре. Состояние накопительных культур в ходе их инкубирования контролировали по изменению количества клеток (прямой счет окрашенных акридин оранжевым препаратов), по изменению состава газовой фазы (хроматографически) и по образованию двухвалентного железа или сульфида (спектрофотометрически). Для изучения филогенетического состава полученных накопительных культур использовали 2-ой пересев.

Анализ филоотипов исходных проб выявило широкую представленность в них бактерий, участвующих в цикле серы (сем. *Ectothiorodospiraceae*, *Thiomicrospiraceae*, MSBL7 и др.), а также микроорганизмов, связанных с циклом железа (*Desulforomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Pseudomonadaceae*). Образец восстановленной грязи отличался большим разнообразием филоотипов. В ходе работы были получены накопительные культуры ацетогенов (*Acetobacterium*), сульфат- (*Fusibacter*, *Dethiosulfatibacter*, *Desulfotignum*) и железоредукторов (сем. *Anaerosomataceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Geobacteraceae*), железоокисляющих бактерий (*Pseudomonas*), органотрофов (*Paraclostridium*, *Sedimentibacter*) и синтрофов (*Acidaminobacter*, *Fusibacter*). Все варианты накопительных культур демонстрировали активный рост микроорганизмов и изменения в газовом и минеральном составе среды. Неожиданно, в культурах, нацеленных на накопление метаногенов, были получены филоотипы ацетогенов. Основную долю всех полученных микробных сообществ составляли сульфидогены. Филоотип, наиболее близкий к некультивируемому семейству MSBL7 в порядке *Desulfobulbales*, составляющий значительную долю в сообществах образцов грязей (51% в окисленном и 14% в восстановленном), был детектирован в накопительных культурах литотрофных сульфат- и железоредукторов, органо- и литотрофных метаногенов. Рутинные пересевы полученных культур железоредукторов привели к их обогащению бактерией, относящейся к недавно описанному нами семейству *Anaerosomataceae* (ранее некультивируемая группа OPB41). Представители этого семейства составляют 5–10% микробных сообществ минеральных вод Эссентуки №4, добываемых скважинами №49-Э и №71 Эссентукского месторождения минеральных вод (Khomyakova et al., 2023).

Таким образом, в ходе работы были выявлены основные таксономические группы, участвующие в анаэробных микробных процессах лечебных грязей озера Тамбукан, Тамбукан.

**Список литературы:**

1. Балахонцев Е.Н. Некоторые результаты биологических исследований Тамбуканского озера (предварительное сообщение) // Записки Русского Бальнеологического Общества в Пятигорске. – 1909. – Т. X. – С. 244–267.
2. Бондарева Г. Л., Деркачева М. Г. Условия формирования, современное состояние и мероприятия по сохранению месторождения лечебной грязи озера Большой Тамбукан // Разведка и охрана недр. – 2017. – №. 1. – С. 51–56.
3. Исаченко Б.Л. О бактериологических исследованиях Тамбуканского озера // Б.Л. Исаченко Избранные труды. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951. – Т. 2. С. 26–143
4. Мальчуковский Л. Б., Старокожко Л.Е., Гайдамака И.И., Чипизубов А.И. Сравнительная характеристика иловой сульфидной грязи озёр Большой Тамбукан и «Солёное» Лушниковского месторождения // Курортная медицина. – 2012. – №. 1. – С. 14–21.
5. Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order Anaerosomatales // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – T. 1047580.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №24-64-00023.*

# ПЕКТОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS* ИЗ ПОРАЖЁННЫХ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ, ВЫРАЩЕННЫХ НА КАМЧАТКЕ

В.А. Платонов<sup>290</sup>, С.Н. Еланский<sup>291, 292</sup>, Е.М. Чудинова<sup>293</sup>

При хранении клубни картофеля подвержены поражению разнообразными микроорганизмами. Тяжелый урон наносят инфекции, вызванные бактериями. Некоторые из них способны нанести значительный урон хранящейся продукции за короткий промежуток времени. В представленной работе рассматриваются пектолитические бактерии, выделенные из клубней, выращенных на Камчатке.

Для исследования отбирали клубни картофеля со следами бактериального или смешанного грибо-бактериального поражения. Бактерии выделяли в чистые культуры и анализировали их способность разлагать ткани клубня картофеля в искусственных условиях. Тест на пектолитическую активность проводили следующим образом: 15 мкл водной суспензии бактерий ( $10^9$  КОЕ/мл) наносили на ломтик картофеля, помещенного во влажную камеру. Опыт проводили при температурах 10 °С и 25 °С. Результаты анализировали через 20 часов. Видовую принадлежность пектолитических штаммов определяли с помощью секвенирования видоспецифичных последовательностей: частей генов, кодирующих 16S рРНК (16S), гиразы субъединицы В (*gyrB*) и Сигма фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoD*).

Выделенные штаммы, обладающие пектолитической активностью, принадлежали двум разным видам: широко известному патогену картофеля *Pectobacterium atrosepticum* и бактерии из рода *Pseudomonas*. Бактерии разных видов были выделены с разных клубней картофеля. Все штаммы проявляли пектолитическую активность при 10 °С и 25 °С, при 10 °С поражение было менее интенсивным.

По всем трем генам наш охарактеризованный штамм В23Кам9В был наиболее похож на *Pseudomonas fluorescens*. По участкам генов *gyrB*, *rpoD* и 16S (депонированные в GenBank последовательности PP429243, PP42924, PP422961) наш штамм был на 99,35%; 99,59%; 99,86% идентичен аналогичным участкам генов штамма *P. fluorescens* CFBR2392 (полногеномная последовательность в GenBank CP133209) соответственно. В литературе ранее имелись сведения о патогенных для картофеля пектолитических

<sup>290</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>291</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>292</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>293</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

бактериях, принадлежащих *P. fluorescens* (Muturi et al., 2018). В этой статье приведены номера последовательностей гена 16S, с которыми сиквенсы авторов были сходны: *P. fluorescens* strain yangyueP7 (KU977136) и *P. fluorescens* TRB (KM527837).

Ранее были описаны патогенные для картофеля бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*: *P. marginalis* pv. *marginalis* (Li et al., 2007), *P. palleroniana* (Zhang et al., 2022). Сравнение последовательностей показало существенное отличие нашего штамма В23Кам9В от штаммов этих бактерий.

Таким образом, мы нашли патогенный для картофеля штамм *P. fluorescens*. По нашим сведениям, ранее патогенных для картофеля бактерий этого вида на территории Российской Федерации обнаружено не было.

### **Список литературы:**

1. Li, J., Chai, Z., Yang, H. et al. First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China// Australasian Plant Disease Notes. –2007. –V.2. – P. 71–73. <https://doi.org/10.1071/DN07029>
2. Muturi P, Yu J, Li J, Jiang M, Maina AN, Kariuki S, Mwaura FB, Wei H. Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya// J Appl Microbiol. –2018. – V. 124(6). – P. 1580–1588.
3. Zhang Y, Peng S, Ren Y, Yao T, Chu H, Gao Y, Tian X. First report of *Pseudomonas palleroniana* causing potato soft rot in China// Plant Dis. – 2022. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0816-PDN>

*Исследование выполнено при поддержке РФФ (грант №23-26-00069).*

# ТРАНСФОРМАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ КАК НОВЫЙ ПОДХОД К СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ СОЗДАНИИ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

О.В. Поленогова<sup>294</sup>, Т.Н. Клементьева<sup>295</sup>, А.С. Артемченко<sup>296</sup>,  
Н.А. Крюкова<sup>297</sup>, В.В. Глупов<sup>298</sup>

Среди биологических средств защиты растений, используемых для контроля численности сельскохозяйственных вредителей, существенную долю составляют препараты на основе энтомопатогенных бактерий, грибов и их метаболитов. Эффективность применения биопрепаратов обусловлена множеством факторов, среди которых решающую роль в восприимчивости насекомых к инфекциям и инсектицидам играет физиология кишечника насекомых и бактериальное сообщество. Любые стрессовые воздействия биотической или абиотической природы способны приводить к нарушению структуры микробного сообщества, что сопровождается синтезом микробиотой биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием. Подобные процессы способны приводить к формированию высокоадаптивных к этим воздействиям микроорганизмов и приобретением ими дополнительных свойств, в том числе вирулентности в отношении хозяина. Данное исследование направлено на раскрытие механизмов взаимодействий симбиотической микрофлоры насекомых и энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*.

Исследование выполнено на личинках природной популяции колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say одного из важнейших вредителей растений семейства Solanaceae. Основное микробное сообщество *L. decemlineata* составляют энтеробактерии, лактококки и внутриклеточные симбиотические бактерии *Spiroplasma leptinotarsa*. Анализ сообщества бактерий кишечника на основе высокопроизводительного секвенирования региона 16S rRNA показал, что развитие бактериальных инфекций, вызванных *B. thuringiensis* и инсектицидами, приводило к значимым сдвигам в структуре сообществ кишечника личинок колорадского жука, связанные преимущественно с повышением обилия и разнообразия энтеробактерий. Преобладающие энтеробактерии

<sup>294</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>295</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>296</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>297</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>298</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

в кишечнике личинок жуков, находящихся в различных патологических состояниях, были выделены и идентифицированы (по гену 16S rRNA). Мы оценили влияние культивируемых энтеробактерий на восприимчивость *L. decemlineata* к энтомопатогенным бактериям *B. thuringiensis*. Реинтродукция энтеробактерий в кишечник личинок жуков показала, что данные симбионты способны значительно ускорять септицемию вследствие развития бактериальной инфекции или токсикоза, вызванного инсектицидами, что сопровождается снижением иммунитета хозяина. В условиях нарушения структуры микробного сообщества энтеробактерии способны приводить к онкоподобным изменениям в клетках тканей кишечника, нарушая их секреторную активность и запуская каскад последовательных иммунных реакций, что может пятикратно повышать восприимчивость насекомых к патогенным микроорганизмам.

Результаты данного исследования позволяют предположить, что выделение высокоактивных штаммов из кишечника насекомых после воздействия на них различными факторами (патогены, инсектициды и др.) является одним из перспективных подходов к селекции микроорганизмов. Подобный подход к селекции позволит получить высоковирулентные штаммы микроорганизмов, способных проявлять высокую инсектицидную активность. Разработка подходов в создании новых биологических препаратов, учитывающих взаимодействия микробиоты насекомых-вредителей сельского хозяйства и их патогенов, важно для создания комплексных и эффективных в применении биопрепаратов, необходимых для расширения возможности получения органической сельхозпродукции.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке  
Российского научного фонда № 22-76-10051.*

# ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МАННАНАЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

М.В. Романова<sup>299</sup>, Н.А. Мирзалиева<sup>300</sup>, А.В. Белодед<sup>301</sup>

Рост потребности в новых источниках энергии и быстрое истощение ископаемых природных ресурсов обуславливают потребность перехода к ресурсосберегающим и экологически чистым технологиям. Одним из решений для минимизации негативных воздействий на окружающую среду является использование биологических катализаторов – ферментов, в качестве альтернативы химическим агентам. По сравнению с традиционными химическими катализаторами, ферменты отличаются высокой эффективностью и специфичностью, а также позволяют проводить процесс в контролируемых «мягких условиях» (умеренная оптимальная температура действия и физиологические значения рН), что позволяет их внедрять в различные промышленные процессы [1]. Маннаназы относятся к группе гидролитических ферментов, катализирующих гидролиз полисахаридной цепи чистых и смешанных маннанов, таких как галактоманнан, глюкоманнан и галактоглюкоманнан. Поскольку маннаны широко распространены в природе и обнаруживаются в растениях, водорослях и грибах, маннаназы имеют перспективы широкого применения в пищевой промышленности для приготовления растворимого кофе и осветления фруктовых соков, в бумажной промышленности для отбеливания бумаги, в составе моющих средств и кормов и других областях. Особый интерес представляют продукты ферментативного гидролиза маннанов – маннанолигосахариды, которые могут действовать как пробиотики-иммуномодуляторы [2]. Для эффективного использования ферментов в промышленности они должны обладать рядом уникальных свойств, а именно термоустойчивостью, рН-стабильностью и химической устойчивостью. Продуцентами таких ферментов могут стать термофильные бактерии, способные развиваться при высоких температурах и синтезировать термостабильные биоактивные метаболиты. Среди термофильных бактерий большой потенциал для получения гидролитических ферментов, в том числе маннаназ, имеют термофильные представители р. *Bacillus*. Помимо синтеза ряда ценных ферментов, штаммы р. *Bacillus* также характеризуются способностью расти на дешевых питательных средах и малотребовательны к наличию в среде факторов роста [3]. Перспективным субстра-

<sup>299</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>300</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>301</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

том для культивирования продуцентов для производства маннаназ является недорогое растительное сырье, содержащее маннаны, например, отходы переработки бобовых культур, отходы производства кофе и др. Целью данного исследования были скрининг термофильных бактериальных штаммов-продуцентов маннаназ и оценка использования доступного сырья растительного происхождения для синтеза маннаназ перспективными штаммами.

В качестве объекта исследования использовали термофильные бактериальные штаммы, выделенные ранее из образцов природного происхождения при 50 °С [5]. Способность к синтезу внеклеточных маннаназ была определена на агаризованных и жидких средах с добавлением галактоманнана (камедь рожкового дерева). По результатам скрининга было отобрано два перспективных штамма-продуцента маннаназ, отнесенных на основе секвенирования гена 16S рРНК к видам *Bacillus subtilis* и *Bacillus velezensis*.

С целью оценки возможности использования растительного сырья для получения маннаназ, в качестве субстратов для культивирования бактерий была использована растительная мука из зерновых и бобовых культур. Высокий выход маннаназ (до 200 ед акт/мл для штамма *Bacillus velezensis* Кб.1.Гл.8 и до 230 ед/мл для штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35) на 24 час роста термофильных культур был отмечен в случае использования амарантовой, гороховой и овсяной муки в составе питательной среды. Исследуемые штаммы могут быть потенциально применены для получения термостабильных маннаназ с использованием недорогого возобновляемого сырья. Дальнейшие исследования могут быть посвящены оптимизации состава питательных сред и условий культивирования для повышения выработки маннаназ, а также изучению их биохимических свойств и анализу потенциала их применения, в том числе для получения маннанолигосахаридов.

### Список литературы:

1. Slimane M., Nabti E.H. Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review // International Journal of Agricultural Science and Food Technology, 2024. – Vol. 10. No. 1. – pp. 006–020. DOI: <https://doi.org/10.17352/2455-815x.000202>
2. Agrawal, P., Verma, D., Daniell, H. Expression of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis. PloS one, 2011. – Vol. 6. – No. 12. e29302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029302>
3. Su Y., Liu C., Fang H., Zhang D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine // Microbial Cell Factories. – 2020. – Vol. 19 – No. 173. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
4. Романова М.В., Кузнецов А.Е., Белодед А.В. Молекулярно-биологическая и биохимическая характеристика внеклеточных протеаз термофильных бактериальных штаммов // Бутлеровские сообщения. – 2021. – Т. 68. – № 12. – С. 103–111.

# ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА КОНВЕРСИИ L-ЛИЗИНА В 1,5-ДИАМИНОПЕНТАН

В.И. Сагидуллина<sup>302, 303</sup>, А.В. Ахова<sup>304, 305</sup>, А.Г. Ткаченко<sup>306</sup>

Одним из актуальных направлений биотехнологии является получение сырья для синтеза полимеров из возобновляемых ресурсов, в том числе с применением микроорганизмов в качестве биокатализаторов [1]. С помощью клеточных или ферментных биокатализаторов в промышленных масштабах могут быть получены полиамины, применяемые для синтеза полиамидов. В частности, такой полиамин как 1,5-диаминопентан, являющийся мономером для синтеза полиамидов марки РА 5Х, может быть получен в результате декарбоксилирования L-лизина с применением выделенных лизиндекарбоксилаз или цельных бактериальных клеток [2,3].

Для дальнейшего совершенствования процесса ведется поиск новых высокоэффективных продуцентов и активных и стабильных лизиндекарбоксилаз.

Целью работы является исследование способности природных изолятов *Escherichia coli* декарбоксилировать L-лизин и возможности их применения в качестве биокатализаторов синтеза 1,5-диаминопентана.

## Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, и 89 природных изолятов *E. coli*, выделенных от животных фермерских хозяйств Пермского края в период 2016–2018 гг.

Для оценки способности природных изолятов продуцировать 1,5-диаминопентан культивирование микроорганизмов проводили в двух различных режимах: 1) в течение 20 часов при  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,5$  и 120 об/мин на качалке GFL-1092 (GFL, Германия), 2) в течение 20 часов при  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $\text{pH} = 5,5$  в термостате без перемешивания.

Для исследования способности природных изолятов преобразовывать L-лизин в 1,5-диаминопентан реакцию биоконверсии субстрата проводили на разных средах: LB, M9, M9 с добавкой 0,4 % раствора глюкозы, физраствор и физраствор с добавкой 0,4 % раствора глюкозы. Каждая среда была взята в двух вариантах: с  $\text{pH} = 7,0$  и  $\text{pH} = 4,0$ .

302 1Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

303 2Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

304 1Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

305 2Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

306 1Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Для получения инокулята микроорганизмы, сохраняемые на скошенном агаре, засеивали в 20 мл жидкой среды LB и культивировали в течение 19–20 часов без перемешивания при  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Полученные бактериальные культуры использовали в качестве инокулята для посева в среды, имеющие разный состав, но содержащие 1 г/л L-лизина. Культивирование проводили в пробирках при  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  без перемешивания. В начальный момент времени, а также через 2, 6 и 24 часа отбирали пробы для измерения оптической плотности культуры и количественного анализа 1,5-диаминопентана в среде культивирования.

Оптическую плотность клеток *E. coli* измеряли с помощью спектрофотометра Infinity 200 (Tecan, Швейцария) при длине волны, равной 600 нм.

Качественное и количественное определение 1,5-диаминопентана проводили с помощью тонкослойной хроматографии дансил-1,5-диаминопентана. Для получения дансил-1,5-диаминопентана предварительно проводили дериватизацию полиамина дансилхлоридом.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований проведен скрининг природных изолятов *E. coli* на способность синтезировать 1,5-диаминопентан в сравнении со штаммом *E. coli* K12. Все природные изоляты были способны продуцировать 1,5-диаминопентан. На основе полученных результатов были выбраны 8 природных изолятов, характеризовавшиеся большей продуктивностью в сравнении со штаммом K12 и другими изолятами, для более подробного исследования их способности конвертировать L-лизин в 1,5-диаминопентан.

На втором этапе было исследовано влияние состава среды культивирования на продукцию 1,5-диаминопентана природными изолятами *E. coli*. Стоит отметить две общие тенденции: 1) при культивировании на богатых средах процесс биоконверсии протекал менее эффективно в сравнении с минимальными средами, 2) в средах с  $\text{pH} = 4,0$  процесс биоконверсии более эффективен по сравнению со средами с  $\text{pH} = 7,0$ . В среде с физраствором и физраствором, содержащим 0,4% раствор глюкозы, количество синтезируемого 1,5-диаминопентана природным изолятом *E. coli* N18 достигало 2 мМ. В результате этой работы выявлен природный изолят *E. coli* N16, обеспечивающий 90% конверсию субстрата с накоплением около 5 мМ 1,5-диаминопентана при культивировании в течение 24 часов на среде M9 с  $\text{pH} = 4,0$ . В этих условиях штамм *E. coli* K12 продуцировал около 2 мМ данного полиамина.

Для дальнейшей работы был выбран природный изолят *E. coli* N16 и наиболее оптимальная среда M9 с  $\text{pH} = 4,0$  для проведения реакции биоконверсии при участии данного изолята. Изучена зависимость скорости биоконверсии от концентрации биомассы. Для получения инокулята с нужной оптической плотностью клетки ночной культуры концентрировали центрифугированием и затем ресуспендировали в питательной среде. В итоге были получены культуры, начальная концентрация биомассы в которых равнялась 0,065 г/л, 0,163 г/л и 0,325 г/л (что соответствовало оптической плотности

равной 0,2, 0,5 и 1,0). Выявлена прямая зависимость скорости процесса биоконверсии и конечной концентрации 1,5-диаминопентана от биомассы. Установлено, что в культуре изолята *E. coli* N16 с оптической плотностью, равной 1, уже на второй час культивирования концентрация 1,5-диаминопентана равнялась 2 мМ, а максимальная полнота конверсии субстрата достигалась через 6 часов реакции биоконверсии.

Также было исследовано влияние содержания глюкозы в среде на конверсию субстрата в продукт реакции. Установлено, что добавка 0,4% раствора глюкозы в среду М9 с рН=4,0, приводит к снижению скорости биоконверсии и конечной концентрации 1,5-диаминопентана. При этом на оптическую плотность культуры добавка глюкозы влияния не оказывала.

На следующем этапе изучена способность микробного биокатализатора сохранять активность при повторном использовании. Установлено, что после четырех последовательных загрузок сохранялось 100% лизиндекарбоксилазной активности биокатализатора на среде М9 (рН=4,0) с добавкой 0,4% раствора глюкозы. В среде М9 с рН=4,0, не содержащей глюкозу, активность снижалась на 60% после четырех циклов реакции.

### Заключение

Таким образом, исследована возможность применения клеток природных изолятов *Escherichia coli* в качестве биокатализаторов конверсии L-лизина в 1,5-диаминопентан. Изучено влияние исходной концентрации биомассы и добавки глюкозы на реакцию биоконверсии. Подобран оптимальный состав среды культивирования бактериальных клеток для наибольшей продукции 1,5-диаминопентана. Получен цельноклеточный биокатализатор – природный изолят *E. coli* N16, способный конвертировать 90% субстрата в продукт реакции на среде М9 с рН, равным 4,0.

### Список литературы:

1. Rosenboom, J.G., Langer, R., Traverso, G. Bioplastics for a circular economy // Nature Reviews Materials. – 2022. – № 7. – С. 117–137.
2. Ma W. et al. Advances in cadaverine bacterial production and its applications // Engineering. – 2017. – Т. 3. – №. 3. – С. 308–317.
3. Young Hoon Oh, et al. Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of L-lysine into cadaverine // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Т. 42 – №. 11. – С. 1481–1491.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки  
и высшего образования РФ (124020500028-4).*

# ВЛИЯНИЕ РО-ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ДИНАМИКУ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК АКТИВНОГО ИЛА В ПРОЦЕССЕ АЭРОБНОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Д.А. Суворов<sup>307, 308</sup>, М.В. Романова<sup>309</sup>, Л.Л. Вакар<sup>310</sup>, А.Е. Кузнецов<sup>311</sup>

В современном Мире одной из приоритетных задач природоохранной деятельности является разработка и совершенствование технологий очистки сточных вод. На кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева с целью создания подходов для повышения эффективности биологической очистки сточных вод разрабатывается новая технология регулируемого оксидативного воздействия (РОВ-технология), использующая для этого следующие технологические подходы: предварительную адаптацию линий активного ила к пероксиду водорода и последующую реализацию очистки в условиях внесения пероксида водорода с одновременным освещением очищаемой воды видимым светом [1]. Благоприятный эффект на очистку при использовании указанных факторов связан, предположительно, с тем, что в клетках микроорганизмов активного ила после оксидативного стресса, индуцированного внесением пероксида водорода, протекают физиологические и биохимические изменения в регуляции клеточных процессов и биосинтезе ферментов [2], что положительно влияет на скорость потребления органических загрязнений. Влияние указанных факторов на процесс очистки и их воспроизводимость в отношении различных модельных систем были подтверждены в исследованиях, проведенных ранее [3, 4]. Однако, для дальнейшего совершенствования РОВ-технологии требуется дальнейшее изучение биохимических причин наблюдаемых положительных эффектов.

При очистке сточных вод микроорганизмы способны разлагать органические загрязнения за счет ферментативных реакций. Важной группой ферментов, участвующих в деструкции органических загрязнений, содержащихся в сточных водах, являются дегидрогеназы. Эта группа ферментов катализирует окислительно-восстановительные реакции переноса протонов от органических субстратов к акцепторам. При очистке, дегидрогеназы обеспечивают окисление различных органических субстратов. Кроме

<sup>307</sup> Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

<sup>308</sup> E-mail: dimitriui@mail.ru

<sup>309</sup> Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

<sup>310</sup> Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

<sup>311</sup> Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

того, величина общей дегидрогеназной активности (ДГА) используется на практике для определения окислительной способности ила и выявления токсичности загрязнений, содержащихся в поступающей на очистку сточной воде. Поэтому исследование динамики изменения ДГА в процессе биологической очистки после РО-воздействия представляет значительный интерес.

Для моделирования процесса очистки использовали модельные сточные воды следующего состава (г/л): ацетат натрия – 0,94; глюкоза – 2,80; пептон – 0,58; дрожжевой экстракт – 0,34;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,22;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,83;  $\text{CaCl}_2$  – 0,40;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,20;  $\text{NaCl}$  – 0,06; ХПК – 3800 мг $\text{O}_2$ /л. Состав модельных сточных вод соответствовал промышленному стоку с высоким содержанием органических загрязнений, аммонийного азота и фосфатов. Преадаптированные к  $\text{H}_2\text{O}_2$  линии ила получали методом многократного пассирования: суспензию клеток ила вносили в свежую модельную сточную воду, культивировали в течение 2-3-х суток при аэрации с перемешиванием при 170 об/мин, а затем вносили  $\text{H}_2\text{O}_2$  до выбранной концентрации и культивировали еще 4–5 суток, после чего отбирали суспензию ила, переносили на свежую среду и повторяли цикл. В опытах с определением динамики изменения ДГА использовали аналогичную схему моделирования очистки. Очистку проводили в темноте или при освещении видимым светом интенсивностью 700 Лк. ДГА определяли с помощью стандартного метода [5] с модификацией, предложенной авторами статьи [6]. Перед анализом 10 мл суспензии клеток ила дважды отмывали центрифугированием от сточной воды и ресуспендировали в 0,2 М фосфатном буфере ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  27,22 г/л, рН 7,4). Анализ проводили с использованием добавления 0,5 мл р-ра (1 г/л) 2.3.5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) и 0,5 мл 0,1 М р-ра глюкозы в качестве субстрата окислительно-восстановительной реакции. Реакцию проводили в течение часа при 37 °С, а затем накопившийся в клетках формазан экстрагировали в раствор этанолом и центрифугировали с последующим отбором супернатанта для анализа. Накопление формазана определяли фотометрически при 480 нм.

Для выявления влияния РО-воздействия сравнивали динамику изменения ДГА клеток активного ила контрольной неадаптированной линии и линии, преадаптированной к 0,16 г  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г АСВ (0,20 г  $\text{H}_2\text{O}_2$ /л), в условиях с внесением 0,20 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  через различные промежутки времени после начала очистки. В результате проведенных исследований было показано, что, эффект от внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в процессе очистки с использованием линии, преадаптированной к 0,16 г  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г АСВ, зависит от фактора освещения, времени, прошедшего после начала очистки, а также количества активных на момент внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  клеток ила. При внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 6 часов после начала очистки наблюдается значительно торможение процесса возрастания ДГА, тогда как эффект от внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 12 часов только кратковременно снижает ДГА, которая потом восстанавливается до исходных значений. В то же время, при внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 15 часов после начала очистки наблюдалось возрастание ДГА, что может свидетельствовать о том, что в таких условиях наблюдается стимулирующее влияние на ДГ активность после вне-

сения  $H_2O_2$ . При этом фактор освещения способен оказывать положительное влияние на скорость возрастания ДГА. Важно отметить, что в отношении неадаптированной линии ила внесение  $H_2O_2$  приводит к более долгосрочному падению ДГА, а также не наблюдается какого-либо стимулирующего влияния после внесения  $H_2O_2$  в разные моменты времени после начала процесса очистки.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при РО-воздействии стимулирующее влияние внесения  $H_2O_2$  на возрастание ДГА наблюдается только в отношении преадаптированной линии ила и в оптимальных условиях – воздействие неоптимальных доз  $H_2O_2$  на неактивные клетки способно тормозить процесс очистки, тогда как в отношении метаболически активных клеток, находящихся в активной фазе роста, наблюдается возрастание активности, что свидетельствует о благоприятном влиянии на процесс биологической очистки.

### Список литературы:

1. Способ биологической очистки сточных вод с регулируемым оксидативным воздействием: пат. 2744230 С1 Рос. Федерация. № 2020118749 / Кузнецов А. Е., Мелиоранский А. В. заявл. 2020.06.07: опубл. 2021.03.0, заявитель Общество с ограниченной ответственностью «ТДС».
2. Lushchak V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals //Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2011. – Т. 153. – №. 2. – С. 175–190.
3. Хохлачев Н. С. Технология биологической очистки сточных вод с применением оксидативного воздействия :дис. – Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти, 2015.
4. Повышение эффективности биологической очистки сточных вод с использованием ров-технологии / Д. А. Суворов, Л. Л. Вакар, М. В. Романова [и др.] // Химическая промышленность сегодня. – 2024. – № 3. – С. 2–8.
5. Методические рекомендации по определению дегидрогеназной активности при технологическом контроле за работой аэротенков. - Министерство жилищно-коммунального хозяйства РСФСР Ордена Трудового Красного знамени, Академия коммунального хозяйства им. К.Д.Памфилова. – Москва, 1978
6. Ryssov-Nielsen H. Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity //Water Research. – 1975. – Т. 9. – №. 12. – С. 1179–1185.

# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПРОЦЕССОВ ВЛИЯНИЯ ИНСЕКТИЦИДОВ НЕОНИКОТИНОИДНОГО РЯДА НА *APIS MELLIFERA*

А.Б. Третьякова<sup>312</sup>

Медоносная пчела (*Apis Mellifera*) является ключевым поллинизатором в сельском хозяйстве и экосистеме в целом. Однако использование неоникотиноидов, широко распространенных пестицидов, может оказывать негативное влияние на популяции пчел. Понимание генетических механизмов, лежащих в основе адаптации *Apis Mellifera* к неоникотиноидам, имеет важное значение для разработки устойчивых стратегий управления пчелами в условиях современного сельского хозяйства. Моделирование процесса адаптации *Apis Mellifera* к использованию неоникотиноидов с использованием генетических характеристик представляет собой сложную задачу. Это может включать в себя анализ генетических данных пчел, эксперименты по выявлению изменений в генах при воздействии пестицидов, а также создание математических моделей, предсказывающих эффекты неоникотиноидов на популяции медоносных пчел.

Этапы систематического обзора были записаны с использованием ROSES. Бесплатный веб-инструмент CADIMA использовался для упрощения сбора данных для этапа отбора заголовков/аннотаций обзора. Чтобы охватить литературу по *Apis Mellifera* и неоникотиноидам для первоначального скрининга использовалась строка поиска («неоникотиноид», «инсектицид», «пестицид») и («пчела», «*Apis Mellifera*», «*A. Mellifera*»). Поскольку термины пестицид и инсектицид часто используются взаимозаменяемо, оба были включены. В итоговую подборку литературы для анализа вошли 112 научных публикаций.

У медоносных пчел есть генетическая изменчивость, которая статистически связана со способностью рабочих пчел выживать при остром воздействии определенных групп неоникотиноидов в течение короткого периода времени [1]. Основным механизмом краткосрочной толерантности связан с аллельными вариантами, которые ставят под угрозу способность генов группы CYP распознавать, связывать и метаболизировать инсектицид. Следовательно, при разработке модели ключевыми генетическими маркерами должны стать гены группы CYP-CYP9Q1, CYP9Q2 и CYP9Q3 [2]. Данные гены являются частью семейства цитохромов P450, которое играет решающую роль в генети-

<sup>312</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ческих адаптационных механизмах при воздействии различных групп инсектицидов, в том числе инсектицидов неоникотиноидного ряда. Исследования показывают, что эти ферменты помогают *Apis Mellifera* метаболизировать вредные соединения. CYP9Q1 и CYP9Q3 могут взаимодействовать с другими изоферментами цитохрома P450, такими как CYP6AS и CYP4G. Эти ферменты также участвуют в метаболизме пестицидов и могут работать совместно, оказывая более эффективное детоксикационное действие. В дополнение к цитохрому P450, другие механизмы детоксикации могут включать ферменты, такие как глутатион S-трансферазы (GST) и эстеразы. Эти ферменты также могут способствовать метаболическим процессам, которые детоксицируют вредные вещества, хотя конкретные исследования их роли в детоксикации NNI у медоносных пчел менее распространены. Активность ферментов после обработки различается в зависимости от дозы, способа введения, продолжительности воздействия и типа образца для анализа [3]. Большинство исследований химического воздействия на *Apis Mellifera* пчел сосредоточены на инсектицидах, в особенности на имидаклоприде.

Результаты моделирования могут быть использованы для разработки стратегий управления *Apis Mellifera* в условиях использования неоникотиноидов. Это может включать в себя рекомендации по минимизации воздействия пестицидов на популяции медоносных пчел, выявление генетических маркеров устойчивости к определенным химическим веществам или создание специализированных линий пчел с повышенной устойчивостью.

### Список литературы:

1. Kim, Y. Validation of quantitative real-time PCR reference genes and spatial expression profiles of detoxication-related genes under pesticide induction in honey bee, *Apis mellifera* / Y. Kim, H. Kim J. Cha, S.H. Kim // PLoS One. – 2022. – 17 (11). – 455–478.
2. Tsvetkov, N. Genetics of tolerance in honeybees to the neonicotinoid clothianidin / N. Tsvetkov, S. Bahia, B. Calla, M.R. Berenbaum, A. Zayed // iScience. – 2023. – 26 (3). – 84–101.
3. Murawska A, Migdał P, Roman A. Effects of Plant Protection Products on Biochemical Markers in Honey Bees / A. Murawska, P. Migdał, A. Roman // Agriculture. – 2021. –11(7) – 648–662.

# АНАЛИЗ ГЕНОМОВ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ НАТРОНОАРХЕЙ РОДА *NATRARCHEOBIUS*

А.С. Туленков<sup>313, 314</sup>, А.Г. Ельченинов<sup>315</sup>, Д.Ю. Сорокин<sup>316</sup>

Экстремально галофильные археи филума *Halobacteriota* населяют различные экосистемы с соленостью, близкой к насыщению, такие как гиперсоленые и содовые озера, солончаки и солевые испарители. Эти микроорганизмы изучаются в течение многих лет, но до недавнего времени представление об их метаболизме было ограничено: преимущественно они считались аэробными гетеротрофами, использующими пептиды и моносахариды в качестве субстратов. Относительно недавно сильно расширилось представление о разнообразии галоархей, использующих для роста полисахариды. Были описаны несколько десятков штаммов, растущих на двух наиболее распространенных нерастворимых полисахаридах, хитине и целлюлозе (Sorokin et al., 2015). Позднее был проведен широкомасштабный скрининг способности галоархей использовать для роста и другие полисахариды (амилопектин, арабинан, ксилоглюкан, маннан, курдлан, галактан). Решающую роль в таком прорыве сыграла постановка накопительных культуры на целевых полимерах. В то же время работ по геномике полисахарид-использующих галоархей до сих пор крайне мало, что делает это направление крайне интересным. В ходе данной работы был проведен подробный анализ геномов двух штаммов галоалкалофильных архей, A-Arcel7 и A-rgal3.

Штаммы A-Arcel7 и A-rgal3 были выделены из образцов поверхностных осадков, отобранных в гиперсоленых содовых озерах Вади-ан-Натрун (Египет) и Кулундинской степи Алтайского края (Россия), путем постановки накопительных культур с добавлением аморфной целлюлозы (A-Arcel7) и пектина (A-rgal3). Позднее для обоих штаммов была подтверждена способность к росту на хитине. Нами были секвенированы и собраны их геномные последовательности. Поиск гомологов генов 16S рРНК с использованием BLAST показал, что штаммы A-Arcel7 и A-rgal3 относятся к семейству *Natrialbaceae*. Филогенетический анализ, основанный на сравнении консервативных белков, позволил нам подтвердить это и также предположить, что данные штаммы принадлежат к новому виду рода *Natrarcheobius* (Рис. 1). До настоящего момента в нем были известны два вида, *N. chitinivorans* и *N. halalkaliphilus*

<sup>313</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>314</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>315</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>316</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

(Sorokin et al., 2019), ключевой особенностью которых являлась способность расти с использованием хитина в качестве субстрата. Кроме того, проведенный анализ показал, что штамм AArch7, ранее описанный как представитель *N. chitinivorans*, скорее всего, относится к отдельному виду. То же верно и для штамма ESP3B, ко-

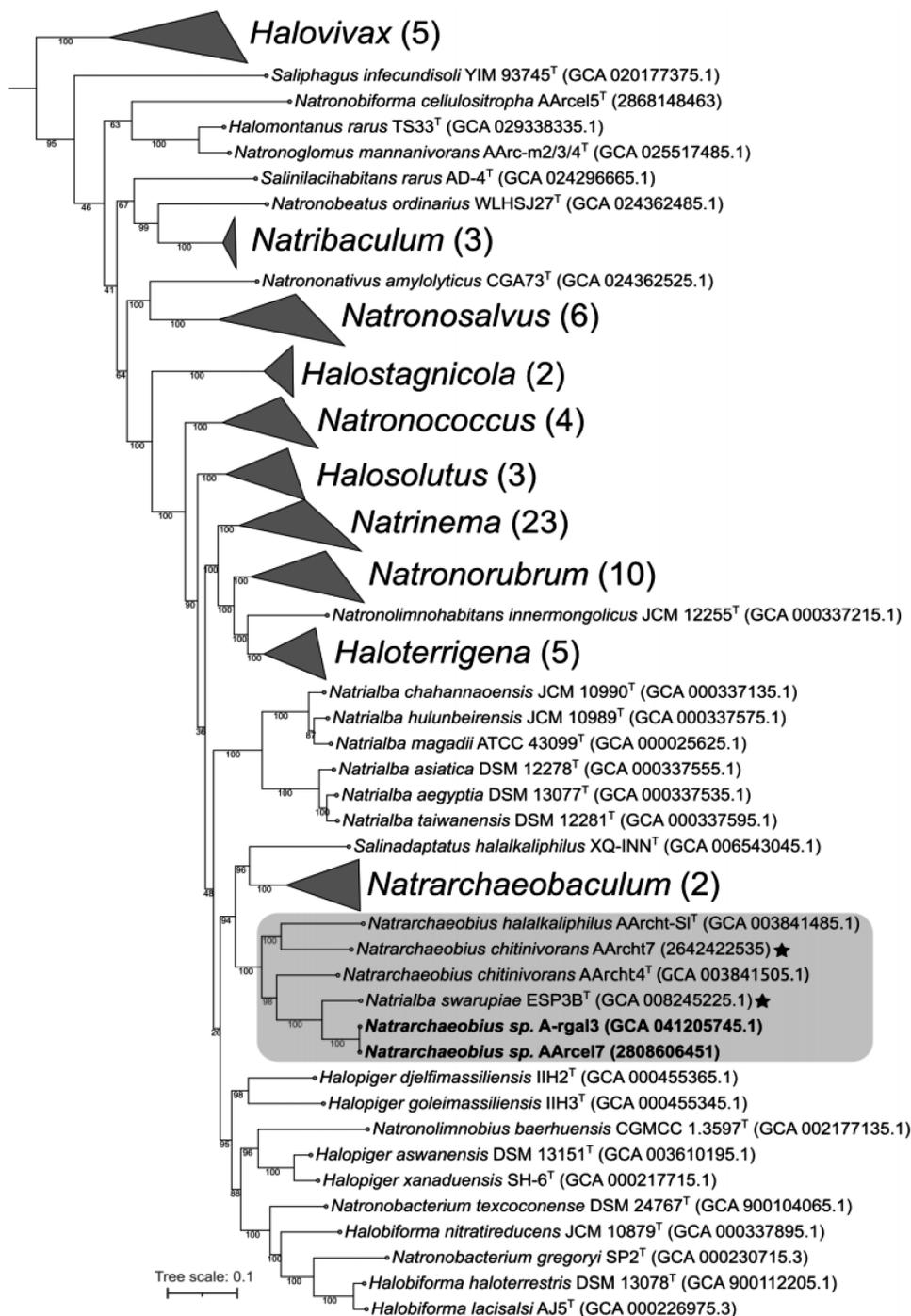


Рис. 1. Филогенетическое дерево семейства Natrionaceae, основанное на сравнении белков из набора "ar122". Серой рамкой выделен род *Natrarchaeobius*. Жирным цветом выделены штаммы, исследуемые в данной работе. Звездочками отмечены микроорганизмы, которые мы предлагаем реклассифицировать

торый был ошибочно классифицирован как *Natrialba swarupiae* (Kajale et al., 2020), и должен быть отнесен к *Natrarchaeobius*.

Эти предположения подтверждаются и геномными сравнениями (ANI, AAI): значение AAI между штаммом AArcht7 и *N. chitinivorans* AArcht4 составляет 77.2%. Значения AAI между *Natrialba swarupiae* и представителями *Natrarchaeobius* составляют 74,5-86,5%, а с представителями *Natrialba* – 70,1-71,6%.

Результаты геномного анализа указывают на то, что все представители рода (за исключением *N. swarupiae*) имеют гены гликозидаз из семейства GH18, что позволяет им осуществлять гидролиз хитина до олигомеров, которые в дальнейшем расщепляются бета-N-ацетилгексозаминидазами из семейств GH3 (AArcel7, A-rgal3, AArcht4, AArcht7 и AArcht-S1) и/или GH20 (AArcht4 и AArcht7). Интересно, что GH18 у штамма AArcht7, *N. chitinivorans* AArcht4 и *N. halalkaliphilus* AArcht-S1, является наиболее многочисленным семейством гликозидаз (от 6 до 11). Помимо этого, нами были обнаружены гены карбогидратэстераз из семейств CE4 и CE14, вероятно, участвующие в деацетилировании моно- и олигомеров хитина\пептидогликана. В геномах *Natrarchaeobius* sp. AArcel7, *Natrarchaeobius* sp. A-rgal3 и *N. swarupiae* ESP3B были также закодированы лизоцимы из семейства GH171, функция которых в данном случае не ясна, однако известно, что некоторые типы пептидогликан-гидролизующих ферментов активны и по отношению к хитину. Способность расти на средах, содержащих хитин, также была продемонстрирована с помощью ростовых экспериментов для всех представителей *Natrarchaeobius*, в геномах которых были обнаружены гены хитиназ. Во всех геномных сборках за исключением *N. swarupiae* были закодированы эндоглюказаны из семейства GH9. В геномных сборках *Natrarchaeobius* sp. A-rgal3 и *Natrarchaeobius* sp. AArcel7 были дополнительно предсказаны гены гликозидаз из семейства GH5 (подсемейства 7 и 41) и целлюлаз из семейства GH12, а также ксиланаз из семейств GH10 и GH11, что может говорить о более широком спектре используемых ими субстратов. Для штамма AArcel7 наблюдалась зона гидролиза аморфной целлюлозы, а также для обоих новых штаммов был подтвержден рост на ксилане и некоторых других полисахаридах.

Таким образом, проведенный нами анализ геномов двух штаммов галофильных архей привел к реклассификации рода *Natrarchaeobius*: штаммы AArcel7 и A-rgal3 будут описаны как представители нового вида внутри *Natrarchaeobius*, предложена реклассификация штамма AArcht7 (ранее *N. chitinivorans*) как отдельного вида, а также перенос *Natrialba swarupiae* в род *Natrarchaeobius*. Более того, было расширено представление о метаболизме рода *Natrarchaeobius*. В отличие от первых известных представителей *Natrarchaeobius* новые штаммы, AArcel7 и A-rgal3, способны расти не только на хитине, но и на ксилане, крахмале и некоторых других полисахаридах. При этом *N. swarupiae*, исходя из данных литературы, способен утилизировать лишь некоторые моносахариды и гликоген. Это четко коррелирует с наборами гликозидаз и карбогидратэстераз, закодированных в их геномах.

**Список литературы:**

1. Sorokin DY, Toshchakov SV, Kolganova TV, Kublanov IV. (2015). Halo(Natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates. *Front Microbiol.* 6:942.
2. Sorokin DY, Elcheninov AG, Toshchakov SV, Bale NJ, Sinninghe Damsté JS, Khijniak TV, Kublanov IV. (2019). *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov., alkaliphilic, chitin-utilizing haloarchaea from hypersaline alkaline lakes. *Syst Appl Microbiol.* 42(3):309-318.
3. Kajale S, Deshpande N, Pali S, Shouche Y, Sharma A. (2020). *Natrialba swarupiae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a hypersaline lake in India. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70(3):1876-1881

# ЭНДОФИТНЫЕ ОРГАНИЗМЫ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

М.В. Тюрин<sup>317</sup>, Л.Ф. Ашмарина<sup>318</sup>, Т.А. Садохина<sup>319</sup>,  
Д.Ю. Бакшаев<sup>320</sup>, В.П. Данилов<sup>321</sup>, В.В. Глупов<sup>322</sup>

Энтомопатогенные грибы *Beauveria* и *Metarhizium* являются вульгарными компонентами почвенной микробиоты активно заселяют зону ризосферы и способны проникать в органы растений. В последние десятилетие появилось значительное количество работ, где бы данные грибы рассматривались в качестве агента повышения иммунитета, стрессоустойчивости и как следствия урожайности.

В нашем исследовании мы сосредоточились на влиянии энтомопатогенных грибов на рост и развитие конских бобов (*Vicia faba* L.) в связи с тем что они в значительной степени поражаются широким кругом фитопатогенов. Исследования были проведены в континентальных условиях западной Сибири. В ходе экспериментов проведённых с 2019 по 2024 год у обработанных растений наблюдалось увеличение биомассы корней, количества ризобиальных клубеньков на корнях, увеличение высоты растений (в среднем на 6–16 см) в экспериментальных вариантах происходило увеличение колоние образующих единиц (КОЕ) энтомопатогенных грибов в прикорневой зоне почвы с последующем снижением до уровня контроля, в зависимости от года колонизация растений была на уровне 0–10 %, а колонизация ризосферы до 36%. Обработка семян грибами приводила к снижению развития и распространенности комплекса болезней конских бобов (в среднем в 5 и 3 раза). в полевых условиях зафиксирована тенденция снижения уровня зараженности семенного материала и фрагментов подземных органов фитопатогенами.

Получены данные о влиянии на микробом зоны ризосферы и ризопланы растений картофеля при инокуляции энтомопатогенным грибом *Metarhizium robertsii*. При этом

---

<sup>317</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

<sup>318</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, р.п. Краснообск

<sup>319</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, р.п. Краснообск

<sup>320</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, р.п. Краснообск

<sup>321</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, р.п. Краснообск

<sup>322</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

энтомопатогенные грибы активно выделялись из зоны ризосферы (80% случаев) а высокая концентрация спор (КОЕ) грибов *Metarhizium* в зоне ризосферы сохранялась до 22 суток. При этом доля гриба постепенно снижалась со временем и оказывала незначительное влияние на биоразнообразие бактерий в зоне ризосферы.

Полученные результаты свидетельствуют, что обработка семян бобов энтомопатогенными грибами *M. robertsii* и *B. bassiana* позволяет улучшить фитосанитарную ситуацию в посевах данной культуры.

# МОДЕЛИРОВАНИЕ IN SITU ОЧИСТКИ ПЛАСТОВОЙ ВОДЫ ОТ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЮЧЕВЫХ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ВЕТВЕЙ ЦИКЛА АЗОТА

В.Н. Усова<sup>323</sup>, А.В. Вишнякова<sup>324</sup>, Т.В. Колганова<sup>325</sup>,  
Н.М. Попова<sup>326</sup>, А.В.Сафонов<sup>327</sup>, Ю.В. Литти<sup>328</sup>

В настоящее время глобальной проблемой является загрязнение подземных вод азотными соединениями, образующимися в результате техногенеза. В России проблема загрязнения подземных вод особенно остро стоит на территории заводов Росатома в Сибири и Удмуртии (АО «СХК» и АО «ЧМЗ»), где в течение более 50 лет происходила фильтрация рассолов нитратов и аммония из шламохранилищ в подземные водоносные горизонты [1]. Целью данной работы было исследование возможности различных стратегий биоремедиации подземных вод с использованием процессов нитрификации, денитрификации и анаэробного окисления аммония нитритом (анаммокс).

Объектами исследования являлись пластовая вода, а также пластовый грунт, загрязненные аммонием и нитратом, отобранные из двух скважин (В2 и V6) на территории ОАО «ЧМЗ». В ходе работы было проведено два последовательных эксперимента (этап 1 и этап 2), различавшихся в исходной концентрации нитрата в очищаемой воде. Эксперименты проводили при периодическом культивировании при 10 °С, аналогично естественным условиям. На первом этапе в реакторы объемом 500 мл вносили загрязненную воду (200 мг NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/л и 150 мг NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/л) и грунт, отобранные на территории АО «ЧМЗ». Как вода, так и грунт содержали природное микробное сообщество, характерное для изучаемого местообитания.

На этапе 1, в реакторах №1 и №2, использующих стратегию денитрификации, были созданы анаэробные условия; при этом в реакторе №1 органические соединения (ацетат и сахара) вводились в низких концентрациях и дробно, в то время как в реактор №2 они

<sup>323</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>324</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>325</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>326</sup> Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

<sup>327</sup> Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

<sup>328</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

подавались сразу в высоких концентрациях. Также в первый (50 сутки) и второй реактор (110 сутки) было добавлено 2 грамма сырой биомассы анаммокс из лабораторного биореактора для стимуляции очистки подземной воды, а также возможной активации аборигенного анаммокс-сообщества. В реакторе №3 была выбрана стратегия осуществления нитрификации с последующей денитрификацией. Эксперимент продолжался 170 суток.

Во этапе 2 исходная концентрация нитрата в очищаемой воде составляла 1000 мг  $\text{NO}_3^-$ -N/л. Для проведения второго этапа эксперимента были использованы четыре реактора, аналогичные тем, что использовались на первом этапе эксперимента. По мере потребления, в первом и втором реакторах было решено вносить органический субстрат в меньшей концентрации (ацетат – 0,249 мг/л) и чаще, а в третьем и четвертом в большей концентрации (ацетат – 0,465 мг/л) и реже. Кроме того, в первом и третьем реакторе была проведена биоаугментация активным анаммокс-сообществом. Эксперимент продолжался 160 суток.

На этапе 1, в реакторах №1 и №2 концентрация  $\text{NO}_3^-$ -N постепенно снижалась и на заключительном этапе упала до 0 мг/л. Однако, концентрация  $\text{NH}_4^+$ -N после начального снижения оставалась на уровне 53 мг/л и 42 мг/л, соответственно. Накопления  $\text{NO}_2^-$ -N в реакторе №2 не наблюдалось. В реакторе №3  $\text{NO}_3^-$ -N и  $\text{NH}_4^+$ -N были полностью удалены. По результатам первого этапа экспериментов было показано, что удаление аммонийного азота в результате процесса частичной денитрификации/анаммокс было не полным. Это могло быть вызвано недостаточно высокой активностью анаммокс-процесса, вероятно ввиду того, что (1) накопления нитритного азота, необходимого для анаммокс-процесса, не происходило, и (2) относительная представленность анаммокс-бактерий в микробном сообществе была недостаточно высокая. Поскольку образующийся в результате денитрификации нитрит быстро расходуется далее денитрификаторами, мы предположили, что активация процесса анаммокс, вероятно, возможна в условиях более высокой концентрации нитратов. Поэтому было решено провести второй эксперимент аналогично первому с использованием пластовой воды и почвенного грунта, но разбавить пробу V6 водой B2 для получения исходной концентрации нитрата – 1000 мг  $\text{NO}_3^-$ -N/л.

На этапе 2 эксперимента стратегия с редким внесением высоких концентраций ацетата и биоаугментацией лабораторной культурой анаммокс бактерий, выбранная в реакторе № 2.1, оказалась наиболее успешной для удаления аммонийного и нитратного азота. Концентрация нитратного и аммонийного азота успешно снизилась до 0 мг/л за 80 дней. После повторного внесения новой порции загрязненной подземной воды взамен очищенной, полное удаление произошло за 40 дней, то есть в 2 раза быстрее. Это говорит о том, что за счет адаптации анаммокс-бактерий к холоду, при постоянном протоке можно добиться более высокой скорости удаления азота в предлагаемой системе частичной денитрификации-анаммокс.

Преобладающим филумом во всех реакторах является Pseudomonadota. В биореакторе нитри-денитрификации за нитрификацию преимущественно отвечали *Nitrospira*

и *Nitrosomonas*, а за денитрификацию – представители филума *Pseudomonadota*. В реакторах частичной денитрификации-анаммокс за денитрификацию отвечали в основном представители *Tolomonas*, *Acidovorax*, *Pseudomonas* и *Nocardioides*, а за процесс анаммокс – род *Candidatus 'Kuenenia'*

Присутствие анаммокс-бактерий было зафиксировано с помощью ртПЦР во всех четырех реакторах на этапе 2 эксперимента. Численность анаммокс-бактерий в реакторе № 1.1 и 2.1 (с биоаугментацией) колебалась в районе  $7,97 \times 10^5$  копий/г в 1 мл. Результаты ртПЦР согласуются с результатами профилирования 16S рРНК и динамикой трансформации аммонийного и нитратного азота. Соответственно, мы можем утверждать об успешности стратегии очистки, заключающейся в биоаугментации анаммокс-культурой и внесении как низких, так и высоких концентраций органического субстрата.

Таким образом, с помощью биотехнологических, микробиологических и молекулярных подходов было проведено исследование стратегий биоремедиации подземных вод, загрязненных нитратом и аммонием, в системе реакторов с нитри-денитрификацией, с активацией анаммокс процесса за счет стимуляции аборигенных психрофильных анаммокс-сообществ и биоаугментации анаммокс-биомассы из «теплого» лабораторного реактора и усиления денитрификации внесением органических субстратов. Впервые установлено, что активация процесса анаммокс возможна в условиях повышенного загрязнения нитратами, поскольку при относительно низких концентрациях нитрата образующийся в результате денитрификации нитрит быстро расходуется далее денитрификаторами, и такая конкуренция подавляет рост и активность анаммокс-бактерий. Система, основанная на активности анаммокс-сообщества сопряженной с денитрификацией, позволит более экономично удалять аммоний и нитрат из грунтовых вод, характеризующихся высокими концентрациями нитратов. Полученные результаты имеют важную как фундаментальную, так и практическую ценность, с последующим возможным внедрением в промышленных масштабах для эффективной и экономичной, а также экологически устойчивой очистки холодных пластовых вод от азотных соединений.

### Список литературы:

1. *Safonov, A.V., Babich, T.L., Sokolova, D.S., Grouzdev, D.S., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Nazina, T.N.* (2018). Microbial Community and in situ Bioremediation of Groundwater by Nitrate Removal in the Zone of a Radioactive Waste Surface Repository. *Frontiers in Microbiology*, 9.

# ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСУРФАКТАНТОВ *GORDONIA AMICALIS* G2

А.С. Филиппова<sup>329, 330</sup>, А.Н. Осина<sup>331</sup>, И.А. Нечаева<sup>332</sup>

Бактерии рода *Gordonia* – это аэробные грамотрицательные актиномицеты, способные к разложению широкого спектра загрязнителей [1, 2]. К таким поллютантам относятся алканы, полиароматические углеводороды, эфиры фталевой кислоты, s-триазин, изопреновый каучук. Следует отметить способность *Gordonia* spp. осуществлять десульфуризацию бензо- и дибензотиофенов. Молекулярные механизмы деградации перечисленных соединений до конца не изучены, однако, есть предположение, что они тесно связаны с продукцией биосурфактантов, повышающих биодоступность гидрофобного субстрата. [2]. В свою очередь сами поверхностно-активные вещества микробного происхождения нашли применение в нефтегазовой, сельскохозяйственной, пищевой промышленности и косметологии [3].

Объектом исследования являются биосурфактанты, продуцируемые штаммом *Gordonia amicalis* G2 при росте на среде, содержащей гексадекан. Используемый в работе штамм выделен из загрязнённого морского песка порта Кат Лай (г. Хошимин, Вьетнам).

Выделение биосурфактантов проводили из кислого бесклеточного супернатанта (рН = 2) экстракцией трет-метилбутиловым эфиром (1:1, об/об). Далее растворитель отгоняли с использованием ротационного испарителя Hei-VAP Expert Control ML/G3B (Heidolph, Германия). Для определения структуры веществ, входящих в экстракт, использовали методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), ИК-Фурье-спектроскопии (ИКФС) и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

ТСХ проводили на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А (ИМИД, Россия) с использованием подвижной фазы хлороформ:метанол:вода (65:15:2). Пластины после анализа окрашивали нафтольным и нингидриновым реагентам (рисунок 1.1, пластины А и Б) и в парах йода (рисунок 1.1, пластина В) для установления наличия углеводного, белкового или липидного фрагментов соответственно.

При анализе пластин после окрашивания положительную реакцию дали пробы на углеводный и липидный компоненты, проба на белок была отрицательна.

<sup>329</sup> Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», лаборатория Экологической и медицинской биотехнологии

<sup>330</sup> ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

<sup>331</sup> ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

<sup>332</sup> 2ФГБОУ ВО Тульский государственный университет

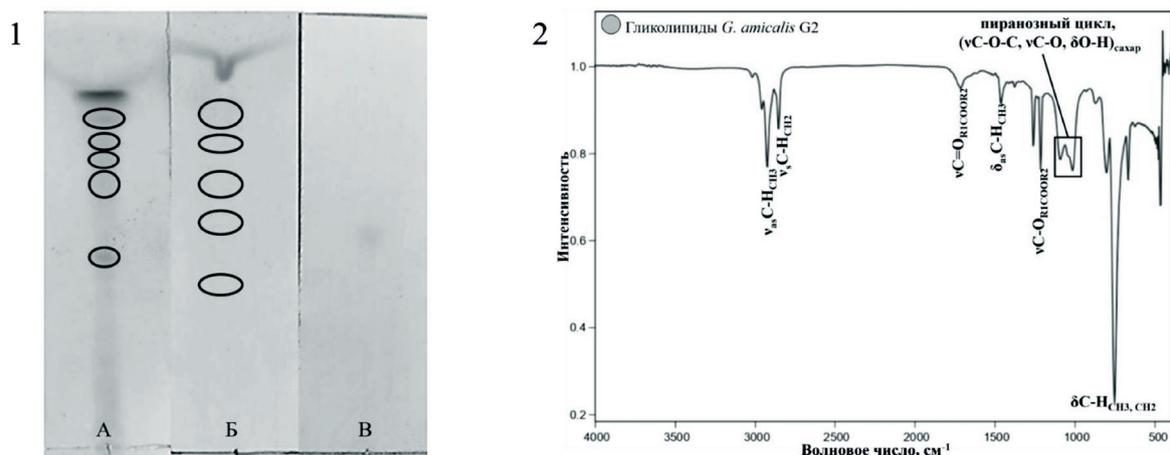


Рис. 1. 1 – Тонкослойная хроматография экстракта гликолипидов штамма *G. amicalis* G2: А – окрашивание нафтальным реагентом, Б – окрашивание в парах йода, В – окрашивание нингидрином; 2 – ИК-спектр экстракта гликолипидов

ИКФС проводили с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на ИК-Фурье-спектрометре ИнфраЛЮМ ФТ-08 (Люмэкс, Россия) в диапазоне  $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$  (рисунок 1.2). В ИК-спектре экстракта гликолипидов содержатся следующие полосы поглощения, характеризующие колебания связи С-Н ( $2922\text{ см}^{-1}$ ,  $2855\text{ см}^{-1}$ ,  $1462\text{ см}^{-1}$ ,  $753\text{ см}^{-1}$ ), колебания пиранозного цикла ( $1095\text{ см}^{-1}$ ,  $1014\text{ см}^{-1}$ ) и колебания связей в сложноэфирной группе ( $1714\text{ см}^{-1}$ ,  $1215\text{ см}^{-1}$ ).

Таким образом, с использованием методов ТСХ и ИКФС доказали, что штамм *G. amicalis* G2 при росте на гидрофобном субстрате продуцирует гликолипидные биосурфактанты, в которых остаток сахара этерифицирован остатками жирных кислот.

Для установления жирных кислот, входящих в состав молекулы биосурфактанта, получили их метиловые эфиры. Состав эфиров определяли методом ГХ-МС с использованием хроматографа «Кристалллюкс-4000М» с МСД «Маэстро-αМС» (НПФ Метта-хром, Россия) (рисунок 2).

При расшифровке полученных масс-спектров установлено, что в состав биосурфактантов входят остатки гексадекановой, гексадеценовой и гептадекатриеновой кислот.



Рис. 2. ГХ-МС спектры метиловых эфиров жирных кислот, входящих в состав биосурфактантов *G. amicalis* G2

**Список литературы:**

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: в 2 т. / под ред. Д. Г. Хоулт [и др.]. – 9-е изд. – Москва: Мир, 1997. ISBN 0-683-00603-7. Текст: непосредственный. 1997. Том 2. 369 с.: ил. – Нокардиоморфные актиномицеты, *Gordonia*: с. 623–624.
2. Drzyzga O. The strengths and weaknesses of *Gordonia*: a review of an emerging genus with increasing biotechnological potential //Critical reviews in microbiology. 2012. Т. 38. №. 4. С. 300–316.
3. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives / Sarubbo L.A., Silva M. de G., Durval I. J. B. [et. al.] // Biochemical Engineering Journal. 2022. Т. 181. С. 108377.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №24-24-20003  
«Поверхностно-активные вещества микробного происхождения –  
многофункциональные биомолекулы и «зеленая» альтернатива химическим аналогам».*

**PETROCELLA PELOPHILA SP. NOV. –  
НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНО АНАЭРОБНАЯ,  
АЛКАЛИФИЛЬНАЯ БАКТЕРИЯ  
ИЗ НАЗЕМНОГО ГРЯЗЕВОГО ВУЛКАНА  
ТАМАНСКОГО ПОЛУОСТРОВА**

**А.А. Фролова<sup>333</sup>, А.Ю. Меркель<sup>334</sup>, Д.С. Копицын<sup>335</sup>, А.И. Слободкин<sup>336</sup>**

Грязевой вулканизм – это широко распространенное геологическое явление: на Земле насчитывается свыше 1700 наземных и подводных грязевых вулканов. Полуостров Тамань – один из регионов с наиболее интенсивным грязевым вулканизмом, здесь расположено 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 FN5suc<sup>T</sup>) с сахарозой в качестве субстрата для роста. Новый изолят имеет 98.4% сходства нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с *Petrocella atlantisensis* (филум *Bacillota*) – анаэробной бактерией, сбраживающей углеродные соединения. Клетки штамма FN5suc<sup>T</sup> представляют собой подвижные, Грамм-положительные палочки. Штамм FN5suc<sup>T</sup> растет при температуре от 10 до 37 °С с оптимумом роста 30 °С. Оптимальное значение рН 9.0, при значении рН ниже 7.5 и выше 10.0 рост не наблюдается. Штамм FN5suc<sup>T</sup> растет при концентрации NaCl от 0 до 5% (вес/об.). Штамм FN5suc<sup>T</sup> использует целлобиозу, D-фруктозу, галактозу, D-глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, рибозу, сахарозу, трегалозу, D-ксилозу, пируват, дрожжевой экстракт. Конечными продуктами сбраживания глюкозы являлись ацетат и СО<sub>2</sub> и следовые количества Н<sub>2</sub> и формиата. Не использует пектин, крахмал, ксилан, формиат, фумарат, сукцинат, лактат, цитрат, малат, метанол, этанол, полигалактуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, пептон и триптон. Не восстанавливает сульфат, сульфит, тиосульфат, элементарную серу, нитрат, нитрит и ферригидрит. Основными соединениями клеточных жирных кислот являются С16:0, С16:1 ω7с и мононенасыщенный диметилацеталь С14:1.

<sup>333</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

<sup>334</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

<sup>335</sup> Университет нефти и газа им. Губкина. E-mail: romana2804@gmail.com

<sup>336</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук

Геном типового штамма имеет размер 3.354.536 п.о. и содержание Г+Ц 37,0 %. В геноме штамма FN5suc<sup>T</sup> содержатся гены, кодирующие ферменты энергетического метаболизма: гликолиза/глюконеогенезиса, ксилулозо-киназы, ксилулозо-изомеразы, нитрогеназы.

На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Petrocella*, как *Petrocella pelovolcani* sp. nov. с типовым штаммом FN5suc<sup>T</sup> (=DSM 113898T = UQM 41591T).

*Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда  
(грант № 22-14-00011).*

# РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У *PANTOEA ANANATIS*

М.С. Харченко<sup>337</sup>, В.С. Скрипникова<sup>338</sup>,  
Ю.Г. Ростова<sup>339</sup>, Н.П. Закатаева<sup>340</sup>

*Pantoea ananatis* – грамотрицательная бактерия, которая принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae* класса *Gamma*proteobacteria. Непатогенный штамм *P. ananatis* AJ13355, выделенный из почвы, является перспективным штаммом для микробного производства полезных веществ, таких как аминокислоты (L-глутамат, L-цистеин, L-аспаратат), изопреноиды и т. д. [Hara et al., 2012; Usuda et al., 2022]. Предыдущие исследования показали, что многие ферменты, участвующие в центральных метаболических путях этого штамма *P. ananatis*, аналогичны ферментам наиболее изученного члена семейства *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli*. Однако участники путей ассимиляции аммиака у этих бактерий, по-видимому, различны [Hara et al., 2012].

Одним из ключевых ферментов, участвующих в метаболизме азота, является глутаматдегидрогеназа (ГДГ), которая катализирует либо восстановительное аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата ( $\alpha$ -КГ) до глутамата (анаболическая реакция, обычно коферментом является НАДФН), либо окислительное дезаминирование глутамата до  $\alpha$ -КГ (катаболическая реакция, обычно коферментом является НАД<sup>+</sup>). Было обнаружено, что на минимальной среде с аммиаком и глюкозой у *P. ananatis* AJ13355 активность ГДГ не определяется, что указывает на то, что в отличие от *E. coli*, основной путь усвоения аммиака в этих условиях проходит через НАДФН-зависимую глутаматсинтазу (ГОГАТ) и АТФ-зависимую глутаминсинтетазу (ГС), а не через ГДГ [Куваева, Москва, 2023]. Анализ нуклеотидной последовательности хромосомы AJ13355 [NCBI GenBank: AP012032.1] не выявил открытой рамки считывания (ORF), кодирующей белок, гомологичный известным ГДГ. Однако предполагаемый ген *gdhA* (*gdhAPa*) был обнаружен в составе мегаплазмиды AJ13355 pEA320 (PAJ\_RS21150) [NCBI GenBank: AP012033.1]. Продукт *gdhAPa* (*GdhPa*) имеет относительно низкий процент аминокислотных остатков (а.к.о.) идентичных ГДГ из *E. coli* (P00370) (27,3%) и является близким гомологом ранее охарактеризованных ГДГ из *Thermus thermophilus* (Q5SI04) и *Thermotoga maritima* (P96110) (59% и 53,6% идентичных а.к.о., соответственно) [Ruiz et al., 1998; Kort et al., 1997]. Ранее мы экспрессировали *gdhAPa* в *E. coli*, очистили и биохимически охарак-

<sup>337</sup> АО «АГРИ», Москва, Россия

<sup>338</sup> АО «АГРИ», Москва, Россия

<sup>339</sup> АО «АГРИ», Москва, Россия

<sup>340</sup> АО «АГРИ», Москва, Россия

теризовали рекомбинантный GdhPa как ГДГ, способную катализировать как восстановительное аминирование, так и окислительное дезаминирование с использованием НАД(Н) и НАДФ(Н) в качестве коферментов в обеих реакциях [Скрипникова и др., 2023]. Известно также, что делеция *gdhAPa* не влияет на рост на минимальной среде с глюкозой, а его экспрессия под контролем собственных регуляторных элементов не восстанавливает прототрофность ауксотрофного по глутамату штамма с делецией *gltB* [Куваева, 2013].

Для выяснения природных механизмов активности ГДГ в AJ13355, была изучена экспрессия *gdhAPa* в различных условиях, таких как голодание по глюкозе, голодание по азоту или рост при высоком содержании солей аммония, на среде с L-глутаматом как 1) единственным источником углерода, или 2) источником углерода и азота; а также рост в условиях окислительного и осмотического стрессов. Увеличение активности фермента (продукции белка GdhPa) наблюдалось (i) в условиях голодания по глюкозе, (ii) когда глутамат использовался как единственный источник углерода и (iii) когда глутамат использовался как единственный источник углерода и азота (рис.1).

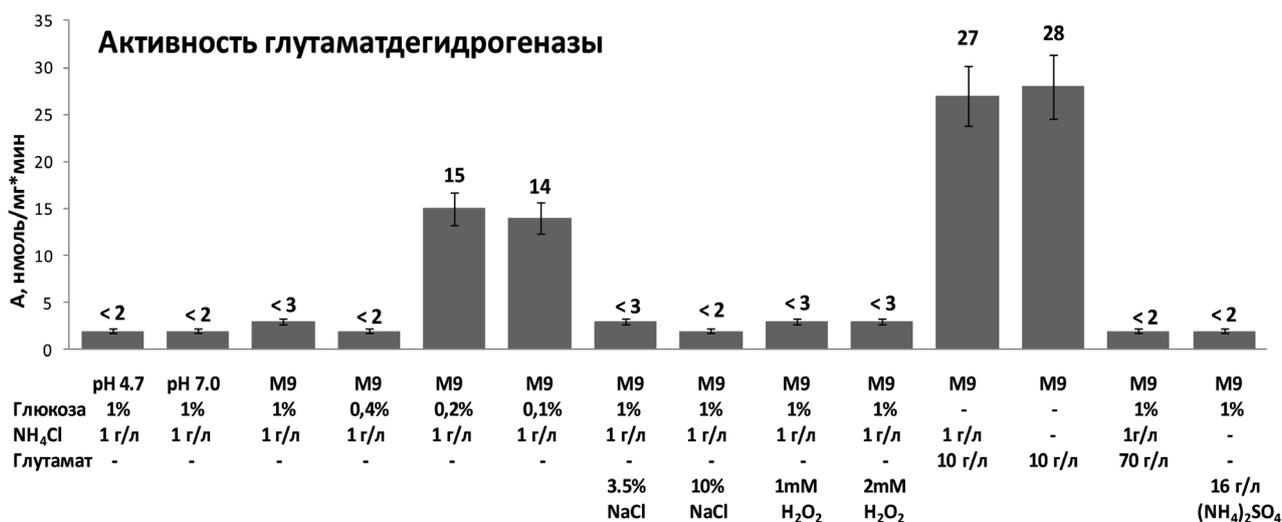


Рис. 1. Профиль активности ГДГ в клетках штамма AJ13355, выращенных в различных условиях.

Столбцы отражают специфическую активность на миллиграмм белка для восстановительного аминирования α-кетоглутарата, измеренную в грубых экстрактах клеток, выращенных в минимальной среде с указанными под графиком концентрациями добавок. Анализы проводились независимо в трех повторах, планки погрешностей отражают стандартные отклонения

Индукция экспрессии *gdhAPa* была подтверждена на уровне транскрипции с помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Клетки, выращенные при низких концентрациях глюкозы или в присутствии 10 г/л L-глутамата без добавления глюкозы, показали в 12–26 раз более высокие уровни экспрессии *gdhAPa*, чем клетки, выращенные в минимальной среде с высокими концентрациями аммиака и глюкозы.

Анализ *in silico* 5' нетранслируемой области *gdhAPa* выявил последовательности, которые в разной степени напоминают сайты связывания РНК-полимеразы с альтернативными сигма-факторами, сигма 54 ( $\sigma_{54}$ ), сигма 32 ( $\sigma_{32}$ ) и сигма 24 ( $\sigma_{24}$ ). В то же время последовательность в позициях -147–116 относительно начала трансляции *gdhAPa* хорошо соответствует консенсусным элементам -10 и -35 промотора сигма 70 ( $\sigma_{70}$ ), что, принимая во внимание низкий уровень экспрессии гена на стандартной среде М9 с глюкозой, может указывать на участие какого-то репрессора(ов) в регуляции экспрессии гена. Для поиска и выяснения роли дополнительных регуляторов экспрессии *P. ananatis* *gdhAPa* необходимы дальнейшие исследования.

Итак, единственный ген, кодирующий ГДГ в биотехнологически важном штамме *P. ananatis* AJ13355, локализован на мегаплазмиде и слабо экспрессируется при выращивании на стандартных минимальных средах с глюкозой и аммонием. Его экспрессия значительно возрастает в условиях глюкозного голодания и при использовании L-глутамата в качестве единственного источника углерода и азота.

### Список литературы:

1. Куваева Т.М. (2013). Изучение факторов, влияющих на биосинтез L-аспарагиновой кислоты в *Pantoea ananatis* и *Escherichia coli*. Дис. канд. биол. наук. Москва
2. Скрипникова В.С., Харченко М.С., Бабаева М.Н., Ростова Ю.Г., Закатаева Н.П. (2021). Глутаматдегидрогеназа с двойной кофакторной специфичностью из *Pantoea ananatis*. Сборник тезисов докладов X Российского Симпозиума «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (Сочи – Дагомыс, Россия, 3–7 октября 2022). Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2021, с. 128–129.
3. Hara Y., Kadotani N., Izui H., Katashkina J.I., Kuvaeva T.M., Andreeva I.G., Golubeva L.I., Malko D.B., Makeev V.J., Mashko S.V., Kozlov Y.I. (2012). The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan;93(1):331-41.
4. Kort R., Liebl W., Labedan B., Forterre P., Eggen R.I., de Vos W.M. (1997) Glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: molecular characterization and phylogenetic implications. *Extremophiles.* 1997 Feb;1(1):52-60.
5. Ruiz J.L., Ferrer J., Camacho M., Bonete M. J. (1998) NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8: purification and enzymatic properties. *FEMS Microbiology Letters.* 159:15-20.
6. Usuda Y., Nishio Y., Nonaka G., Hara Y. (2022). Microbial Production Potential of *Pantoea ananatis*: From Amino Acids to Secondary Metabolites. *Microorganisms.* May 31;10(6):1133.

# АНАЛИЗ ПРОЦЕССА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БИОМАССОЙ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АКТИВНОГО ИЛА

А.А. Хасанова<sup>341</sup>, А.С. Сироткин<sup>342</sup>

Избыточное поступление соединений фосфора и азота приводит к развитию процесса эвтрофикации, сокращению биологического разнообразия и рекреационной ценности природных водоемов. Эффективность удаления биогенных элементов из сточных вод традиционными технологическими схемами биологических очистных сооружений достигает в среднем не более 50%.

Особый интерес для интенсивной биологической очистки сточных вод представляет применение биопленочных реакторов. Многие исследования посвящены изучению технологии MBBR (реактор с биопленкой с подвижным слоем), осуществляющий комбинированное удаление соединений углерода, азота и фосфора. Доказано, что при обеспечении стабильных микроаэробных условий эффективность биологической дефосфатации сточных вод может достигать в среднем 90% [1]. Одной из инновационных разработок является SNDPR-реактор для удаления соединений фосфора и азота при эндогенной денитрификации и нитрификации [2]. В условиях соблюдения оптимального соотношения углерода и других биогенных элементов, а также при обогащении биореактора полифосфат-аккумуляторными микроорганизмами эффективность удаления фосфора фосфатов из модельного раствора сточных вод достигает 99,8%. Для реализации технологии SNDPR был предложен аэробный гранулированный ил (AGS) в процессе его культивирования на оптимальной среде для развития различных микробных групп [3].

На сегодняшний день идентифицированы представители фосфатаккумуляторных бактерий: *Proteobacteria* (pp. *Dechloromonas*, *Pseudomonas*, *Ca. Accumulimonas*, *Quatrionicoccus*, *Malikia*, *Lampropedia*, *Candidatus Accumulibacter*), *Actinobacteria* (pp. *Tetrasphaera*, *Microlunatus*, *Tessaracoccus*, *Candidatus Microthrix*, *Friedmaniella*) и *Gemmatimonadetes* (p. *Gemmatimonas*). Установлено, что микробная биопленка играет значительную роль в накоплении фосфат-ионов из сточных вод. Например, синергетический эффект в процессе биоаккумуляции соединений фосфора биопленкой был

<sup>341</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

<sup>342</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

отмечен при совместном культивировании *Comamonas denitrificans* и *Acinetobacter calcoaceticus* [4].

Система очистки сточных вод биопленкой является перспективной технологией в области эффективного извлечения фосфат-ионов из сточных вод коммунального-бытового характера. В связи с этим особый интерес представляет исследование динамики процесса поглощения/высвобождения фосфора микробной биопленкой в биофильтрационной установке для интенсификации процесса биологической дефосфатации сточных вод.

**Целью работы** являлась экспериментальная оценка эффективности удаления соединений фосфора с помощью лабораторной биофильтрационной установки в отъемно-доливном режиме культивирования.

**Объектом исследования** выступал активный ил биологических очистных сооружений г. Иннополис, Республика Татарстан.

В лабораторном биофилт্রে рабочим объемом 0,15 л осуществлялось культивирование микробного сообщества активного ила. Подача свежей питательной среды и удаление культуральной жидкости проводили с помощью перистальтического насоса. Для поддержания оптимальной концентрации растворенного кислорода в биофилтре подавался сжатый воздух компрессором SB-348A (Китай, «BARBUS»). В качестве инертного носителя использовали фракцию керамзит диаметром 10–12,5 мм.

Пусковой период включал в себя накопление биомассы на керамзите путем рециркуляции надилловой жидкости и модельного раствора сточной воды в среднем в течение 10 суток при 20 °С. Далее для оценки эффективности биологического удаления фосфат-ионов осуществляли отъемно-доливное культивирование иммобилизованной биомассы микроорганизмов в модельном растворе сточной воды. Для сравнения степени изъятия соединений фосфора из питательной среды в качестве контроля использовали суспензионную биомассу надилловой жидкости в аналогичных условиях постановки эксперимента.

Начальная концентрация соединений фосфора в биофильтрационной установке поддерживалась в диапазоне от 19,8 до 22,3 мг/дм<sup>3</sup>. Общая эффективность процесса дефосфатации поступающего модельного раствора сточной воды для иммобилизованной и суспензионной биомассы активного ила составило в среднем 84 и 75%, соответственно. Для иммобилизованной биомассы содержание микроорганизмов на инертном носителе составило 0,7 мгАСБ/г носителя. Количество суспензированных клеток в контрольной биофильтрационной установке достигало  $11 \times 10^{12}$  КОЕ/л мл.

На основании полученных экспериментальных данных следует сделать вывод о том, что микробная биопленка способна интенсифицировать процесс дефосфатации сточных вод в биофильтрационных установках без создания дополнительных зон с различной концентрацией растворенного кислорода как в EBPR-технологии, реализующей глубокое удаление соединений фосфора. В связи с этим очевидный научный и практический интерес представляет дальнейшее изучение механизма биотрансформации фосфат-ионов биопленкой полифосфат-аккумулирующих микроорганизмов.

**Список литературы:**

1. Yunxiao J., Dahu D., Chuanping F., Shuang T., Takashi S., Feng Z. Performance of sequencing batch biofilm reactors with different control systems in treating synthetic municipal wastewater // *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 104. P. 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.086>.
2. Ya-nan L., Yue Y., Zhonghong G., Jiaqi Y., Guanglei W., et al. Achieving simultaneous nitrification and endogenous denitrifying phosphorus removal in anaerobic/intermittently-aerated moving bed biofilm reactor for low carbon-to-nitrogen ratio wastewater treatment // *Bioresource Technology*. 2024. Vol. 394. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130178>.
3. Li G., Tooker N.B., Wang D., Srinivasan V., Barnard J.L., Takacs I., et al. Modeling side-stream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) system using agent-based model with adaptive maintenance, decay and TCA metabolism. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.387589>.
4. Onnis-Hayden A., Srinivasan V., Tooker N.B., Li G., Wang D., Barnard J.L., et al. Survey of fullscale sidestream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) systems and comparison with conventional EBPRs in North America: Process stability, kinetics, and microbial populations // *Water Environ Res*. 2020. P. 403–417.

# ГИДРОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ, ПРИНАДЛЕЖАЩЕЙ К НОВОМУ ВИДУ РОДА *THERMOSPHERA*

М.И. Чос<sup>343, 344</sup>, А.Г. Ельченинов<sup>345</sup>, К.С. Заюлина<sup>346</sup>

Род *Thermosphaera*, относимый к семейству *Desulfurococcaceae*, представлен на текущий момент времени единственным культивируемым видом *Thermosphaera aggregans* штамм M11TL<sup>T</sup>, который был выделен из горячего наземного сольфатарного источника «Обсидиановый бассейн», расположенного в Йеллоустонском национальном парке (США). Данный штамм является гипертермофильным, строго анаэробным гидролитиком (Huber et al., 1998). Для *T. aggregans* показан рост на дрожжевом экстракте, пептоне, желатине, аминокислотах, термообработанном ксилане и глюкозе. Добавление акцепторов, например S<sup>0</sup>, ингибирует рост данного микроорганизма.

В ходе данной работы из образца, отобранного в горячем источнике возле вулкана Тингуиририка (Чили) была получена чистая культура кокков, штамм 3507, на анаэробной среде Пфеннига с добавлением лишенина в качестве субстрата, при 85 °С. Сходство полной последовательности гена 16S рРНК штамма 3507 показало 99,67% идентичности с таковой у *Thermosphaera aggregans* M11TL<sup>T</sup> (Spring et al., 2010). Однако, полногеномные сравнения AAI и ANI составили 86,5% и 83,2% соответственно, что является ниже пороговых значений для выделения нового вида (Zayulina et al., 2020). Это указывает на то, что штамм 3507 является представителем нового вида в роде *Thermosphaera*.

Целью данной работы является описание метаболизма и гидролитических способностей нового штамма 3507 рода *Thermosphaera*.

Основными методами работы было культивирование штамма и функциональный анализ генома. Культивирование осуществлялось на анаэробной среде Пфеннига с добавлением различных субстратов, в том числе полисахаридов. Путём культивирования исследовали рост на субстратах, способность выживать в микроаэрофильных условиях а также определяли оптимальные условия роста. Анализ продуктов метаболизма проводили с помощью газо-жидкостной хроматографии. При функциональном анализе генома проводили BLAST аминокислотных последовательностей белков с известной

<sup>343</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>344</sup> Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>345</sup> Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>346</sup> Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия

активностью, отобранных из баз данных метаболических путей и белков против генома целевого организма и наоборот.

Исследуемый в данной работе штамм 3507 способен расти на различных полисахаридах и моносахаридах с помощью брожения: крахмале, декстрани, аморфной целлюлозе,  $\alpha$ -целлюлозе, ксилане, гуаровой камеди, мальтозе, глюкозе, галактозе и ксилозе. Стоит отметить, что способность расти на целлюлозе показана впервые для данного рода. Штамм 3507 растет при значениях pH от 4,0 до 8,0 и значениях температуры от 55 °C до 92 °C (оптимальные условия роста составляют 85 °C и pH 6,5–7), а также способен выдерживать наличие кислорода в среде. В качестве продуктов брожения на крахмале были идентифицированы  $H_2$ ,  $CO_2$ , ацетат и этанол. Продукция  $H_2$  и этанола при метаболизировании крахмала впервые показана для архей данного рода и, скорее всего, обусловлена работой [NiFe] дегидрогеназы IV группы, бифункциональной пируватоксидоредуктазы-пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы, чьи детерминанты обнаружены в геноме. Функциональный анализ генома позволил выявить гены центральных метаболических путей: гликолиз представлен полностью, в то время как пентозофосфатный цикл и цикл трикарбоновых кислот представлены частично. В геноме штамма 3507 обнаружено наличие большего количества детерминант гликозидаз (например, альфа-амилаза) и пептидаз в отличие от *T. aggregans* M11TLT. Кроме того нами проведен филогенетический анализ класса *Thermoprotei*, основанный на сравнении консервативных белков, который подтвердил статус нового вида для штамма 3507.

#### Список литературы:

1. Zayulina K. S. et al. Complete genome sequence of a hyperthermophilic archaeon, *Thermosphaera* sp. Strain 3507, isolated from a Chilean Hot Spring //Microbiology Resource Announcements. – 2020. – Т. 9. – №. 50. – С. 10. 1128/mra. 01262-20.
2. Huber R. et al. Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1998. – Т. 48. – №. 1. – С. 31–38.
3. Spring S. et al. Complete genome sequence of *Thermosphaera aggregans* type strain (M11TL T) //Standards in Genomic Sciences. – 2010. – Т. 2. – С. 245–259.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант # 23-14-00312).*

# СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ И НЕЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ В СТИМУЛИРОВАНИИ ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ПРИ АНАЭРОБНОМ СБРАЖИВАНИИ

С.В. Шехурдина<sup>347</sup>, Е.А. Журавлева<sup>348</sup>, А.А. Лайкова<sup>349</sup>, А.А. Ковалев<sup>350</sup>,  
Д.А. Ковалев<sup>351</sup>, А.А. Иваненко<sup>352, 353</sup>, Н.Г. Лойко<sup>354</sup>, Ю.В. Литти<sup>355</sup>

Анаэробное сбраживание (АС) в настоящее время зарекомендовало себя как эффективный способ получения возобновляемой энергии в виде богатого метаном биогаза из различных органических отходов. Эффективность разложения субстрата и устойчивость систем АС по отношению к различным ингибиторам могут быть значительно улучшены путем стимуляции прямого межвидового переноса электронов (DIET). Одним из многообещающих способов усиления DIET является использование электропроводящих материалов. Электропроводящие свойства и физико-химические характеристики материалов благоприятно влияют на стабилизацию микробного сообщества, образование биопленок, обогащение синтрофными группами микроорганизмов и повышение выхода метана за счет передачи электронов напрямую между электроактивными партнерами [1]. Согласно литературным данным, состав электроактивного микробного сообщества может существенно различаться в зависимости от природы материала-носителя, а электропроводность биомассы в большей степени зависит

<sup>347</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>348</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>349</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>350</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>351</sup> Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Россия

<sup>352</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>353</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

<sup>354</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

<sup>355</sup> Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологии» РАН, Институт Микробиологии имени С. Н. Виноградского, Москва, Россия

от метаболической активности и доминирующих групп микроорганизмов[2]. В связи с этим некоторые из текущих проблем в понимании DIET включают определение биосовместимости микробных сообществ с материалами-носителями и оценку влияния электропроводности на эффективность АС.

Целью данной работы являлось изучение эффективности АС высококонцентрированной смеси летучих жирных кислот (ЛЖК) с использованием различных материалов-носителей с электропроводящими (карбонный войлок (CF) и сетка из нержавеющей стали (SM)) и неэлектропроводящими (полиэфирный войлок (PF) и стекловолоконная сетка (FM)) свойствами. В качестве субстрата использовалась смесь  $C_2H_3O_2Na$  (121 мМ или 7,14 г/л),  $C_3H_5O_2Na$  (49 мМ или 3,57 г/л) и  $C_4H_7O_2Na$  (21 мМ или 1,79 г/л) в конечной концентрации 12,5 г/л. В качестве инокулята использовался термофильно сброженный навоз крупного рогатого скота. Эксперимент проводили в анаэробных условиях в стеклянных флаконах ёмкостью 265 мл с объёмом жидкой фазы 200 мл при 55 °С.

Максимальный кумулятивный выход метана наблюдался во флаконах, содержащих неэлектропроводящие материалы, в частности PF и FM, и составил  $243,5 \pm 6,0$  и  $223,6 \pm 2,1$  мл  $CH_4$ /г ХПК, соответственно, что было на 47% и 35% выше, чем в контроле без материалов ( $165,9 \pm 9,2$  мл  $CH_4$ /г ХПК). Флаконы с SM показали результаты, сходные с FM, без статистически достоверной разницы ( $p \geq 0,05$ ). Внесение CF давало более низкий выход метана –  $178,8 \pm 9,7$  мл  $CH_4$ /г ХПК, что всего на 7% больше, чем в контроле. Скорость разложения ЛЖК была примерно одинаковой для всех флаконов. Однако на 38-й день эксперимента концентрация пропионата во флаконах с PF была на 9% ниже по сравнению с контролем. Наилучшая эффективность удаления ХПК/ЛЖК в конце эксперимента наблюдалась при внесении PF и составила 88%. Эффективность удаления ХПК<sub>ЛЖК</sub> для C, SM, FM и CF была ниже и составила 86%, 84%, 84% и 82%. При использовании PF в качестве материала-носителя наблюдалось улучшение превращения ХПК субстрата в  $CH_4$  на 14,3% по сравнению с контролем и на 28,3% и 14,7% по сравнению с группами CF и SM, соответственно. Параметр эффективности преобразования энергии показал значительное улучшение до 23% во флаконах с PF по сравнению с контролем и до 47,8% и 24,8% по сравнению с CF и SM, соответственно. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показали разные закономерности формирования биопленок на поверхностях CF и PF. В частности, на волокнах CF присутствовало прикрепление отдельных клеток, но основная полисахаридная матрица находилась в межслойном пространстве, в то время как формирование биопленки на PF происходило в основном вдоль и вокруг волокон. Кроме того, в биопленках на PF отмечалось двукратное увеличение синтеза внеклеточных полимерных веществ при относительно низком количестве клеток. Анализ циклических вольтамперограмм биопленок на PF показал наличие окислительно-восстановительных пиков вблизи +0,15 В, что характерно для белков, участвующих во внеклеточном переносе электронов. Также по сравнению с контролем было отмечено существенное увеличе-

ние электропроводности ( $34,6 \pm 4,2 \mu\text{См/см}$ ) и электрохимической емкости ( $4,8 \mu\text{Ф/см}^2$ ) биопленки, достигающее 230 % и 20%, соответственно.

Анализ относительной численности основных групп микробного сообщества показал доминирование представителей рода *Methanothermobacter* среди архейного компонента и представителей рода *Hydrogenispora*, класса *Limnochordia* и группы MBA03 класса *Limnochordia* среди бактериального компонента взвешенной и прикрепленной биомассы всех экспериментальных групп. В зависимости от материала-носителя в биопленках наблюдалась специфичность обогащения определенными группами микроорганизмов. В частности, в биопленках на PF отмечалось более высокое минорное разнообразие гидрогенотрофных метаногенов родов *Methanocorpusculum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* и преимущественное обогащение синтрофными и потенциально электроактивными группами, такими как *Clostridia* D8A-2 и DTU014, *Acetomicrobium*, *Lentimicrobium*, *Syntrophaceticus* и *Dethiobacteraceae uncultured*. Рода *Bacillus* и *Ureibacillus* были обнаружены исключительно в биопленках групп FM и SM, в то время как семейство *Dethiobacteraceae* практически отсутствовало в биопленках группы SM. Корреляционный анализ Пирсона показал положительную корреляцию *Methanothermobacter* с *Syntrophaceticus*; *Methanobrevibacter* с *Syntrophaceticus*, *Acetomicrobium* и *Dethiobacteraceae uncultured*; *Methanocorpusculum* с *Acetomicrobium*, *Hydrogenispora* и *Methanoculleus* с *Lentimicrobium*. Интересно отметить, что представители родов *Bacillus* и *Ureibacillus* показали отрицательную корреляцию со всеми гидрогенотрофными метаногенами ( $p < 0,05$ ). Прогнозирование основных метаболических функций в группе PF показало увеличение липидного и энергетического обмена, синтеза кофакторов и реакций метаногенеза, а также активности различных клеточных и биосинтетических процессов, что согласуется с наиболее высокой продукцией метана. Согласно полученным результатам, для стимуляции DIET могут быть использованы более дешевые, но при этом более биосовместимые, неэлектропроводящие материалы, что позволит повысить производительность, стабильность и экономическую эффективность процесса АС.

### Список литературы:

1. Wu, L., Jin, T., Chen, H., Shen, Z., Zhou, Y. Conductive materials as fantastic toolkits to stimulate direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: new insights into methanogenesis contribution, characterization technology, and downstream treatment // J. Environ. Manage. – 2023. – Vol. 326. – P. 116732.
2. Martins, G., Salvador, A.F., Pereira, L., Alves, M.M. Methane production and conductive materials: a critical review // Environ. Sci. Technol. – 2018. – Vol. 52. – № 18. – P. 10241-10253.

Работа выполнена при поддержке гранта НЦМУ «Агротехнологии будущего»  
№ 075-15-2022-318.

# ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМОВ MORPHOSATCHER В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ

Ф.В. Ширшиков<sup>356</sup>

Широкое внедрение технологий высокопроизводительного секвенирования геномов привело к необходимости пересмотра многих таксономических рангов бактерий и вирусов, а в некоторых случаях и созданию новых таксонов. Особенно чувствительна к такого рода изменениям в систематике область молекулярной диагностики патогенов. Многие мишени, ранее считавшиеся видоспецифичными и консервативными, с появлением в базах множества полногеномных последовательностей целевых и близких видов потеряли диагностическую ценность. Таким образом, в диагностике патогенов весьма актуальна проблема валидации специфичности мишеней, применяемых в сельском хозяйстве и клинической диагностике.

В настоящем исследовании для решения проблемы скрининга подходящих мишеней для выявления патогенных бактерий и вирусов разрабатывались два основных направления: 1) поиск и расположение на концах праймеров групп-специфичных нуклеотидов в наиболее консервативных генах [1]; 2) скрининг видоспецифичных генов, характерных для известных штаммов целевого патогена. Для каждого направления были созданы алгоритмы на основе методов сравнительной геномики, позволяющие в короткий срок идентифицировать мишень, совместимую с методом петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Цель настоящего исследования заключалась в апробации разработанной технологии скрининга диагностических мишеней в процессе разработки тест-систем на основе метода LAMP. Объектами исследования стали возбудители чёрной ножки и мягкой гнили картофеля из рода *Dickeya*, а также возбудитель туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis*, для которых найденные мишени удалось валидировать экспериментально. В другой группе объектов были вирус Зика и коронавирус SARS-CoV-2, для которых предложены новые мишени и проведён дизайн генотип- и видоспецифичных праймеров соответственно.

При создании тест-системы на бактериальных патогенов картофеля проводился поиск скоплений видоспецифичных полиморфизмов гена *infB*, которые были размещены на концах праймеров. Применяя детекцию сигнала реакций LAMP в режиме реального времени удалось продемонстрировать дифференциацию трёх наиболее опасных для

<sup>356</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия

картофеля видов, таких как *D. solani*, *D. dianthicola* и *D. dadantii*, от других известных представителей рода *Dickeya* и *Pectobacterium*. По всей видимости, высокая аналитическая специфичность разработанной тест-системы обеспечивается кумулятивным эффектом нуклеотидными полиморфизмами, которыми отличаются целевые патогены от близкородственных.

В процессе создания тест-системы для дифференциальной диагностики *M. tuberculosis*, названной ТБ-ИЗАТЕСТ [2], проведена валидация списка из потенциально видоспецифичных мишеней. Из предложенных 30 генов [3] критериям видоспецифичности в пределах порядка *Mycobacteriales* обладали только 9 генов, как установлено позднее. Поэтому аналогичный анализ было решено провести de novo, используя в качестве основы для инклюзивной панели референсный геном типового штамма *M. tuberculosis* H37Rv<sup>T</sup>, а в качестве эксклюзивной панели геномы из базы RefSeq Representative Genomes ( $n = 32437$ ). Попарный поиск генов, специфичных для *M. tuberculosis* проводился с применением различных алгоритмов BLAST, по результатам которого было найдено 35 видоспецифичных мишеней, из которых 14 генов были общими с перечнем из [3]. Ген *lppQ*, использованный в качестве мишени в тест-системе ТБ-ИЗАТЕСТ, найден в геномах репрезентативных штаммов известных генетических линий (L1–L9), а также в геномах всех вариантов вида *M. tuberculosis* [4].

Вирусы человека, геном которых представлен РНК, представляют особую сложность при разработке тест-систем, поскольку они обладают высокой нуклеотидной изменчивостью. Таким образом, основной задачей при работе с вирусными патогенами является скрининг наиболее консервативных участков генома, обладающих разрешением, которого достаточно для дифференциации разных видов вирусов, либо генотипов внутри целевого вида.

Для вируса Зика известны два генотипа – азиатский и африканский. Генотипирование вируса Зика имеет в большей степени эпидемиологическое значение, однако разработанные на этом объекте подходы в перспективе могут найти применение для диагностики других видов вирусов, имеющих больше природных генотипов, например, вируса гепатита С. В этой части исследования проанализировано 876 полных геномов вируса Зика с высоким качеством последовательности, проведено множественное выравнивание геномов и найдены скопления специфичных для каждого генотипа нуклеотидных позиций ( $n = 1161$ ), которые составили ~11 % от всего консенсуса в 10269 нт. Все гены были ранжированы по количеству позиций, пригодных для генотипирования. Идентичные гены в разных генотипах имели существенные отличия в GC-составе, достигающие 1–2 %. Максимальным разрешением обладал ген NS5.

Поиск надёжной мишени для диагностики коронавируса SARS-CoV-2 потребовал иного подхода, основанного на первичном скрининге наиболее консервативного гена. Для этого с помощью базы COVID CG было проанализировано все доступные геномы ( $n = 14988625$ ) за период 01.12.2019–15.05.2024. Обнаружено, что за весь период пандемии COVID-19 лишь ген *nsp16* не накопил стабильных нуклеотидных замен

или инделов, при этом данный ген никогда ранее не применялся в качестве мишени для диагностики SARS-CoV-2. Далее, этот ген был проанализирован в других видах коронавирусов, опасных для человека, к которым относят SARS-CoV-1, MERS-CoV, HCoV-NKU1, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63. Так, было установлено, что большинство выявленных видоспецифичных позиций, характерных для каждого вида, сосредоточено в 3'-концевой части.

Таким образом, была разработана и апробирована новая технология скрининга мишеней в геноме различных патогенов бактериального и вирусного происхождения. Она позволяет в достаточно короткие сроки проанализировать полные геномы целевого патогена и выявить подходящие для метода LAMP диагностические мишени. Стоит отметить, что предложенные алгоритмы MorphoCatcher для консервативных и уникальных генов совместимы и с другими способами амплификации нуклеиновых кислот.

#### **Список литературы:**

1. Shirshikov *et al.*, 2019. PeerJ, V. 7, P. e6801
2. Shirshikov & Bespyatykh, 2023. Russ J Bioorg Chem, V. 49, P. 1279–1292
3. Goig *et al.*, 2020. Bioinformatics, V. 36, P. 985–989
4. Riojas *et al.*, 2018. Int J Syst Evol Microbiol, V. 68, P. 324–332

# ВИДЫ КОМПЛЕКСА *FUSARIUM INCARNATUM-EQUISETI* НА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПАСЛЕНОВЫХ РАСТЕНИЯХ В РОССИИ

М.М. Ярмеева<sup>357, 358</sup>, А.Ф. Белосохов,  
Е.М. Чудинова<sup>359</sup>, С.Н. Еланский<sup>360, 361</sup>

Виды рода *Fusarium* являются одними из наиболее вредоносных патогенов сельскохозяйственных культур. На настоящий момент род разделен на 23 комплекса видов и включает в себя более 400 видов (Gomez-Chavarría et al., 2023). Внутри одного из самых обширных комплексов видов, *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC), было описано уже 30 филовидов (Xia et al., 2019), среди которых есть как патогены растений, так и сапротрофы. В России виды рода *Fusarium* до сих пор определяют, как правило, по морфологическим критериям, что представляется совершенно недостаточным для выявления реального разнообразия признанных на настоящий момент видов.

Для исследования разнообразия видов *Fusarium* пораженные вегетативные и генеративные органы пасленовых растений были собраны в разных регионах Европейской части России: Московской, Астраханской, Саратовской областях, в Краснодарском крае. Всего было выделено и исследовано 23 изолята, принадлежащих к FIESC: 4 с листьев картофеля, по одному с плода баклажана и корней перца, 17 штаммов с плодов и листьев томата. Видовую идентификацию проводили по культурально-морфологическим и молекулярным признакам. Определяли последовательности частей генов фактора элонгации (*tef-1α*) и β-тубулина (Elansky et al., 2024). 13 штаммов разных видов с разных хозяев были проверены на патогенность к клубням картофеля и плодам томата по методике, описанной в Yarmeeva et al. (2023).

По результатам молекулярного анализа штаммы с листьев и стеблей картофеля были отнесены к видам *F. equiseti* (3 штамма) и *F. incarnatum* (1 штамм). Штамм с перца был определен как *F. compactum*, а с баклажана – *F. clavum*. На томате были обнаружены виды *F. clavum* (11 штаммов), *F. citri* (1 штамм), *F. compactum* (2 штамма), *F. ipomoeae* (1 штамм) и *F. luffae* (2 штамма).

<sup>357</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>358</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>359</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

<sup>360</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>361</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

*F. equiseti* – один из немногих видов, описанных на томате в России (Kokaeva et al., 2020; Chudinova et al., 2020). Остальные выявленные в работе виды не были ранее отмечены на пасленовых растениях в нашей стране, но на томатах их обнаруживали зарубежные коллеги: *F. clavum* в Италии (Gilardi et al., 2021), *F. luffae* в Китае (Sun et al., 2024). С перца в Китае был выделен *F. citri* (Wang et al., 2019), но на томате он пока не отмечен. Таким образом, исходя из результатов, полученных в данной работе, 3 вида для томата (*F. citri*, *F. compactum*, *F. ipomoeae*), один вид для перца (*F. compactum*) и один для баклажана (*F. clavum*) можно считать новыми находками для данных растений в мире, а еще два вида (*F. clavum* и *F. luffae*) – новыми для томата в России.

При проверке на патогенность не было выявлено корреляции между растением-хозяином, с которого был выделен штамм, и степенью патогенности к плодам томата и клубням картофеля. Все протестированные штаммы оказались способны поражать плоды томата, но агрессивность зависела от штамма и различалась даже внутри одного вида. К клубням картофеля штаммы показали слабую патогенность. Возможно, со слабой патогенностью штаммов из FIESC к клубням связан тот факт, что ни одного изолята, принадлежащего к этому комплексу, не было выделено из пораженных сухой гнилью клубней картофеля, выращенных в разных регионах России (протестировано более 110 изолятов). Вместе с тем исследования в южных странах (Azil et al., 2021; Elansky et al., 2024) показали встречаемость видов из FIESC в пораженных сухой гнилью клубнях картофеля.

Комбинация морфологических и молекулярных методов идентификации позволила расширить список видов *Fusarium*, встречающихся на пасленовых растениях в России. Полученные в работе данные позволяют выявить скрытое разнообразие патогенов пасленовых растений и оценить наносимый ими ущерб продукции картофеля и томата.

### Список литературы:

1. Azil N. et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tuber dry rot and wilt of potato in Algeria //European Journal of Plant Pathology. – 2021. – Т. 159. – №. 3. – С. 495–509.
2. Chudinova E. M., Shkunkova T. A., Elansky S. N. Fungal pathogens of tomato in South-Western Russia (Krasnodar territory) //Вестник защиты растений. – 2020. – Т. 103. – №. 3. – С. 210–212.
3. Elansky A. S. et al. *Fusarium* species affecting potato tubers and tomato fruits in Uganda //Mycology and Phytopathology. – 2024. – Т. 58. – №. 2. – С. 161–172.
4. Gilardi G. et al. First report of *Fusarium clavum* causing leaf spot and fruit rot on tomato in Italy //Plant Disease. – 2021. – Т. 105. – №. 8.
5. Gomez-Chavarria D. A., Rua-Giraldo A. L., Alzate J. F. An evolutionary view of the *Fusarium* genome. – 2023.
6. Kokaeva L. et al. Fungal diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves and fruits in Russia //Journal of Central European Agriculture. – 2020. – Т. 21. – №. 4. – С. 809–816.
7. Sun X. et al. First Report of Fruit Rot Caused by *Fusarium luffae* in Cherry Tomato in China //Plant Disease. – 2024. – Т. 108. – №. 3. – 788.
8. Wang J. et al. Species composition and toxigenic potential of *Fusarium* isolates causing fruit rot of sweet pepper in China //Toxins. – 2019. – Т. 11. – №. 12. – 690.

9. Xia J. W. et al. Numbers to names-restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex //Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. – 2019. – Т. 43. – №. 1. – С. 186–221.
10. Yarmeeva M. et al. *Colletotrichum* species on cultivated Solanaceae crops in Russia //Agriculture. – 2023. – Т. 13. – №. 3. – 511.

*Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда  
(грант № 23-16-00048).*

*Научное издание*

# АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

XIV молодежная школа-конференция с международным участием.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 6–8 ноября 2024 г.

Дизайн обложки К. Заюлина

Верстка Е. Игнатьева

Сдано в набор 26.09.2024 г. Формат 60x90/16.

Печать офсетная. Тираж 100 экз. Бумага офсетная.

Подписано в печать 21.10.2024 г. Заказ 1016.

Отпечатано в типографии «ВАШ ФОРМАТ»

г. Москва, ул. Донская, 32.

+7 (495) 749-45-84

[www.kniga-premium.ru](http://www.kniga-premium.ru)