



МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

2023

Материалы
XIII Международной
научной конференции

Минск, 6–9 июня 2023 г.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Отделение биологических наук
ГНПО «Химический синтез и биотехнологии»
Институт микробиологии
Белорусское общественное объединение микробиологов

**МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

Материалы
XIII Международной научной конференции

Минск, 6–9 июня 2023 г.

Минск
«Беларуская навука»
2023

УДК 606:579.6(082)

ББК 30.16я43

М59

Организационный комитет конференции:

А. А. Шепшелев (председатель), Т. В. Семашко (заместитель председателя),
О. Д. Левчук (секретарь), А. И. Зинченко, И. Н. Ананьева, Л. Н. Валентович, Е. М. Глушень,
Н. А. Головнева, Л. И. Сапунова, А. В. Сидоренко, В. А. Щетко, А. А. Барейко, Г. В. Бабич

Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XIII Междунар. науч. конф. (Минск, 6–9 июня 2023 г.) / орг. ком. конф.: А. А. Шепшелев (пред.) и [др.]. – Минск : Беларуская навука, 2023. – 466 с.

ISBN 978-985-08-3004-3.

В сборнике представлены материалы выступлений участников XIII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» по следующим направлениям: физиология, биохимия и генетика микроорганизмов; микробный синтез биологически активных соединений, генно-инженерное конструирование микроорганизмов, коллекции микроорганизмов; биотехнологии для сельского хозяйства; биотехнологии для медицины и промышленности; природоохранные биотехнологии.

Представляет интерес для специалистов в области микробиологии и биотехнологии.

УДК 606:579.6(043.2)

ББК 30.16я43

ISBN 978-985-08-3004-3

© Институт микробиологии НАН Беларуси, 2023

© Оформление. РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Секция 1. Физиология, биохимия и генетика микроорганизмов

<i>Besarab N.V., Hrusha P.A., Romaniuk L.V., Zlatohurska M.A., Tovkach F.I., Evtushenkov A.N.</i> <i>Erwinia</i> phage tail-like bacteriocins.....	17
<i>Besarab N.V., Letarov A.V., Belalov I.S., Golomidova A.K., Kulikov E.E., Babenko V.V., Ivanova K.V., Besarab S.V., Evtushenkov A.N.</i> A novel temperate <i>Erwinia amylovora</i> bacteriophage Stean	19
<i>Karakozova M.V., Raldugina V.N., Nazarov P.A.</i> Sequence- and structure-based computational protein analysis of the MDR pump AcrAB-TolC from <i>Escherichia coli</i> in context of antibacterial action of substances	21
<i>Abdul Bari Md., Nazarov P.A.</i> The role of TolC-containing MDR pumps in pumping out the main antibiotics	23
<i>Nazarov P.A., Noskov S., Abdul Bari Md., Raldugina V., Karakozova M.</i> Multidrug resistance pumps as a keystone of bacterial resistance: new approaches	26
<i>Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.</i> Получение рекомбинантного белка Hfq <i>Pseudomonas putida</i> BS3701 в гетерологичной экспрессионной системе.....	27
<i>Андронов Е.Е.</i> Перспективы метагеномных подходов в анализе почвенной микробиоты в фундаментальной и прикладной науке	28
<i>Арашкова А.А., Летвинова В.С., Тригубович А.М.</i> Встречаемость грибов рода <i>Aspergillus</i> среди микромицетов – агентов биоповреждений материалов и контаминантов пыли.....	29
<i>Бондарева К.С., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П.</i> Сравнительный анализ структуры нормального и мутантного белка MAPEG-семейства у <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	31
<i>Бузиков Р.М., Казанцева О.А., Пилигримова Э.Г., Рябова Н.А., Шадрин А.М.</i> Бактериолитические свойства бактериофага iF6 и его эндолизиннов	33
<i>Годовалов А.П.</i> Микроорганизмы – продуценты полиаминов в структуре бактериального сообщества генитального тракта	35
<i>Горелик К.М., Мямин В.Е.</i> Характеристика микроорганизмов, выделенных из орнитогенных почв Восточной Антарктиды.....	37
<i>Грибанова Е.А., Охремчук Е.В., Семенчукова Е.А., Гигиняк Ю.Г., Мямин В.Е.</i> Молекулярно-биологическая идентификация дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктики	39
<i>Денисенко В.В., Найденко И.А., Сафонова М.Е.</i> Продукция L-молочной кислоты бактериями видов <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> и <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	41

<i>Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Богун А.Г., Благодатских С.А., Козлов А.И., Сизова А.А., Соломенцев В.И., Стариков П.П., Абрамов А.А., Воробьев А.Н., Дубицкий К.А., Козлов Н.А., Кошелева У.В., Мезин М.Г., Петрухин Д.Д., Съедин Д.Ю.</i> Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов – система электронного учета штаммов в коллекциях патогенных микроорганизмов.....	43
<i>Елисеева А.Д., Максимова Ю.Г.</i> Изменение метаболической активности алкалофильного <i>Vacillus aequororis</i> 5-ДБ при различных рН и концентрации хлорида натрия	46
<i>Еськова А.И., Пономарева А.Л.</i> Описание нового вида – сульфатредуцирующей бактерии, выделенной из донных отложений Японского моря	48
<i>Иванова Е. В., Позднякова-Филатова И. Ю.</i> Разработка тест-системы для поиска новых регуляторных РНК	51
<i>Казанцева О.А., Шадрин А.М.</i> Умеренные бактериофаги: недооценённый потенциал профагов в экологии и эволюции бактерий.....	53
<i>Кислицын В.Ю., Чулкин А.М., Рожкова А.М.</i> Влияние нокаута гена внутриклеточной β-глюкозидазы на индукцию транскрипции гена целлюбиогидролазы 1 <i>Penicillium verruculosum</i>	55
<i>Копосова О.Н., Казанцева О.А., Семкин Д.А., Кулябин В.А., Скорынина А.В., Рябова Н.А., Шадрин А.М.</i> Характеристика бактериофага <i>Enterococcus</i> B1578 и его эндолизина 1578 NALAA	57
<i>Корженков А.А.</i> Высокопроизводительные методы для геномной таксономии промышленно значимых аскомицет.....	59
<i>Корниенко М.А., Беспятых Д.А., Городничев Р.Б., Веселовский В.А., Шитиков Е.А.</i> Вирулентные бактериофаги <i>Staphylococcus aureus</i> : оценка литического потенциала и характеристика устойчивых штаммов.....	61
<i>Королев Н.А., Егорова Д.О.</i> Анализ штаммов-деструкторов бифенила, выделенных из антропогенно загрязненных экотопов.....	63
<i>Купцов В.Н., Мандрик-Литвинкович М.Н., Левченко Д.Д., Коломиец Э.И.</i> Скрининг стрессоустойчивых бактерий рода <i>Vacillus</i> , обладающих антимикробной активностью	65
<i>Лавренова В.Н., Суркова Д.Е., Шестакова А.А., Осмоловский А.А.</i> <i>Aspergillus</i> sp. – продуценты протеаз, специфичных в отношении определённых глобулярных и фибриллярных белков.....	67
<i>Левданская А.И., Веремеенко Е.Г.</i> Анализ экспрессии генов феназинового оперона у бактерий <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> на стадиях транскрипции и трансляции	69
<i>Леонович С.И., Максимиук Е.В., Дегтярик С.М., Сидоренко А.В.</i> Видовое разнообразие псевдомонад, вызывающих болезни рыб в рыбоводческих хозяйствах Республики Беларусь	71
<i>Леонтьевская Е.А., Кудрякова И.В., Афошин А.С., Тарлачков С.В., Руденко П.А., Леонтьевская Н.В.</i> Литический потенциал штамма <i>Lysobacter gummosus</i> 10.1.1	73
<i>Максимова А.М., Светлова А.С., Арашкова А.А.</i> Выделение грибов рода <i>Cladosporium</i> из пораженных строительных материалов и разработка праймеров для их идентификации	75
<i>Максимова Ю.Г.</i> Влияние углеродных нанотрубок на биопленкообразование бактерий окружающей среды	77

<i>Мельников О.И., Егорова С.В., Розова О.Н.</i> Облигатный метанотроф <i>Methylotheobacterium alcaliphilum</i> 20Z как продуцент фумарата: генетические и биохимические аспекты	79
<i>Мельников О.И., Розова О.Н.</i> Ферменты пути утилизации маннита у метилотрофа <i>Methylobrevia pamukkalensis</i> РК2.....	81
<i>Морозова А.Н., Головнева Н.А.</i> Гликозил-гидролазы бактерии <i>Bifidobacterium longum</i>	83
<i>Муратова А.А., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н.</i> Молекулярно-генетический анализ плазмид термофильных бактерий <i>Sutcliffiella horikoshii</i> ВАТ	85
<i>Муратова А.А., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.</i> Секвенирование и сборка генома бактерии <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> 8, возбудителя угловатой пятнистости листьев огурца	87
<i>Нечаева И.А., Суворова В.В., Парфенова А.С., Филиппова А.С.</i> Влияние стрессовых факторов на продукцию вторичных метаболитов у бактерий рода <i>Rhodococcus</i> : физиологический и геномный аспекты.....	89
<i>Николайчик Е.А., Вычик П.В., Колубако А.В., Дюбо Ю.В., Шарангович М.С., Игнатенко Е.И.</i> Транскрипционная регуляция в патосистемах с участием <i>Pectobacterium</i> spp.....	91
<i>Носков С.А., Абдул Бари, Каракозова М.В., Назаров П.А.</i> Помпы множественной лекарственной устойчивости и их роль в образовании биопленок на примере хлорамфеникола.....	93
<i>Орловская П.И., Барейко А.А., Леонович С.И., Сидоренко А.В.</i> Реидентификация коллекционных штаммов <i>Rhodococcus erythropolis</i> с помощью ПЦР-анализа и многолокусного секвенирования	95
<i>Охремчук Е.В., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Корзун Е.В., Мямин В.Е., Гигиняк Ю.Г.</i> Метагеномический анализ керн из озера Нижнее, Земля Эндерби, Восточная Антарктида.....	97
<i>Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н.</i> Конструирование и характеристика делеционного мутанта <i>Erwinia amylovora</i> по гену транскрипционного регулятора <i>mprA</i>	100
<i>Плеханова Н.С., Шитенкова Е.В., Липкин А.В.</i> Влияние Nε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы <i>Escherichia coli</i>	102
<i>Позднякова-Филатова И.Ю.</i> Конструирование штамма <i>Pseudomonas putida</i> АК5, содержащего мутации в регуляторной области генов катаболизма салицилата	104
<i>Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А.</i> Эффект метаболитов на рост пробиотических культур	106
<i>Рябинина М.В., Зелинский А.А., Рубель А.А.</i> Применение микроорганизмов для поиска новых амилоидогенных белков человека.....	108
<i>Савич В.В., Герасимович А.Д., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Сидоренко А.В.</i> Характеристика бактериофага БИМ BV-113, активного в отношении бактерий <i>Glutamicibacter halophytocola</i>	110
<i>Сафонова М.Е., Найдено И.А., Денисенко В.В.</i> Сравнительная оценка гидрофобных свойств клеточной поверхности и способности к адгезии у лактобацилл.....	112
<i>Семенчукова Е.А., Муратова А.А., Валентович Л.Н.</i> Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов, выделенных из рыбных пресервов	114

<i>Сидоренко М.Л.</i> Механизмы солюбилизации фосфора бактериями и место этих знаний в рабочей программе дисциплины «Физиология микроорганизмов»	116
<i>Сиколенко М.А., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н.</i> Корректировка результатов метатаксономических экспериментов: внесение поправок на число копий генов 16S рРНК, рассчитанных согласно базам данных RiboGrove и <i>rrnDB</i>	118
<i>Слайковский С.Н., Крицкая Л.А., Сапунова Л.И., Кулиш С.А.</i> Скрининг осмотолерантных дрожжей для кормопроизводства.....	121
<i>Слизень В.В., Суркова Л.К.</i> Генетическая гетерогенность <i>Mycobacterium tuberculosis</i> генотипа Beijing: подтипы b0/w148 и 94-32	123
<i>Тригубович А.М., Гончарова И.А., Соколова Т.В., Сосновская Н.Е.</i> Сорбция свинца и кадмия ксеро- и психротолерантными микромицетами архивной пыли.....	125
<i>Хархасова И.А., Константинов А.В., Острикова М.Я., Коваленко С.А.</i> Морфолого-культуральные свойства <i>Morchella importuna</i> при выращивании на естественных и искусственных питательных средах	127
<i>Чайка Н.Я., Захарченко Н.С., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф., Позднякова-Филатова Т.Ю., Ахметов Л.И., Шутов А.А., Делеган Я.А., Звонарев А.Н., Филонов А.Е.</i> Фитостимулирующие свойства штамма-нефтедеструктора <i>Rhodococcus qingshengii</i> F2-2.....	130
<i>Черней И.С., Чещевик В.Т.</i> Генетическая регуляция формирования биопленки <i>C. tropicalis</i>	133
<i>Шарангович М.А., Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А.</i> Транскрипционный фактор SlyA фитопатогенных бактерий – сенсор растительных фенольных соединений.....	135
<i>Ширинкина Л.И., Тактарова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Котова И.Б.</i> Особенности жизнедеятельности анаэробного микробного сообщества при длительном контакте с отходами из вспененного полистирола	137

Секция 2. Микробный синтез биологически активных веществ.

Генно-инженерное конструирование микроорганизмов.

Коллекции микроорганизмов

<i>Geraskina N.V., Fedorova E.N., Kivero A.D., Stoyanova N.V.</i> Some features of an acetoin biosynthesis by bacteria from the genus <i>Bacillus</i>	140
<i>Gharaviri M., Ahangaran M., Fomenko I.A., Mashentseva N.G.</i> Enzymatic Production of biologically active peptides in plant materials.....	142
<i>Wenqiang Fan., Fengling Shi.</i> Drought and salt induced specific rhizosphere related bacteria enhance the adaptability of alfalfa to stress	144
<i>Абай Г.К., Бержанова Р.Ж., Чоманов У.Ч.</i> Исследование физиолого-биохимических свойств лактобактерий для применения в сыроделии	146
<i>Абдульмянова Л.И., Буриева М.Р., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Гулямова Т.Г.</i> Биоактивность меланинового пигмента эндофитного гриба <i>Cladosporium</i> sp. – HT207	148
<i>Афошин А.С., Кудрякова И.В., Тарлачков С.В., Леонтьевская Е.А., Зеленов Д.В., Руденко П.А., Леонтьевская Н.В.</i> Транскриптомный подход для поиска новых перспективных антимикробных ферментов <i>Lysobacter capsici</i> ВКМ В-2533 ^Т	150
<i>Белоусова Е.Б., Юрченко Е.А., Юрченко А.Н.</i> Сокультивирование микроскопических грибов как способ усиления их биотехнологического потенциала.....	152

<i>Богатырева М.Д., Романова М.В., Белодед А.В.</i> Выделение и характеристика термофильных бактерий, обладающих амилολитической активностью	154
<i>Боркунов Г.В., Чингизова Е.А., Леценко Е.В.</i> Подбор условий культивирования микроскопического морского гриба <i>Penicillium velutinum</i> КММ 4674 с помощью стратегии OSMAC	156
<i>Боркунов Г.В., Чингизова Е.А., Леценко Е.В.</i> Поликетиды морского микроскопического гриба <i>Penicillium raistrickii</i> КММ 4718	158
<i>Буко А.И., Сафонова М.Е., Денисенко В.В., Головнева Н.А.</i> Продукция D-изомера молочной кислоты молочнокислыми бактериями рода <i>Lactobacillus</i>	160
<i>Вычик П.В., Дигрис А.В., Дувалов Е.И., Скакун В.В., Николайчик Е.А.</i> Классификатор бактериальных транскрипционных факторов	162
<i>Гапонова И. И., Щетко В. А., Романова Л. В., Макаревич О.В.</i> Разработка метода выделения полисахаридов молочнокислых бактерий <i>Lactobacillus helveticus</i>	164
<i>Герасимович А.Д., Сидоренко А.В.</i> Сравнительная характеристика литической активности бактериофагов <i>Lactococcus lactis</i> , выделенных из природных и производственных мест обитания	166
<i>Дайнеко А.В., Чиндарева М.А., Зинченко А.И.</i> Создание химерной конструкции, кодирующей онконазу, слитую с белком-партнером Sumo	168
<i>Далинова А.А., Дубовик В.Р., Федоров А.Н., Радюпов В.Э., Ванюкова Л.А., Алексеева А.Н., Берестецкий А.О.</i> Стабильность и пути деградации 10-членных лактонов – перспективных грибных фитотоксинов для защиты растений	170
<i>Долбунова А.Н., Романова М.В., Евдокимова С.А., Суворов Д.А., Барашина В.Р., Хромова Н.Ю., Белодед А.В.</i> Идентификация и биохимическая характеристика термофильных бактерий, синтезирующих молочную кислоту	172
<i>Дубовик В.Р., Далинова А.А., Берестецкий А.О.</i> Природные 10-членные лактоны: источники, структурное разнообразие, спектр биологической активности и перспективы использования.....	174
<i>Дудик П.С., Армянинова Д.К.</i> Создание регулируемой системы CRISPR-Cas12a для редактирования генома микобактерий	176
<i>Дудун А.А.</i> Контролируемый биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата бактериальным штаммом <i>Azotobacter vinelandii</i> 12	178
<i>Евдокимова О.В., Муратова А.А., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.</i> Получение флуоресцентно меченого штамма бактерий <i>Vacillus altitudinis</i> 11-1-1-GFP.....	180
<i>Жила Н.О., Сапожникова К.Ю., Волова Т.Г.</i> Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата, природным штаммом <i>Cupriavidus necator</i> B-10646 и исследование свойств полученных полимеров.....	182
<i>Жуковская Л.А., Семашко Т.В., Судакова Е.С.</i> Свойства внеклеточной холестеролоксидазы <i>Raenarthrobacter aureus</i>	184
<i>Жунисжан А.Ж., Бержанова Р.Ж., Абай Г., Кудобаев А., Мукашева Т.Д., Оразалы А.</i> Слизиобразующие бактерии – возможные продуценты поверхностно-активных веществ с эмульгирующими свойствами.....	186
<i>Жураева Р.Н., Зайнитдинова Л.И., Ташпулатов Ж.Ж., Лазутин Н.А., Косимов Д.И., Эргашев Р.Б.</i> Изменчивость бактерий рода <i>Pseudomonas</i> при хранении различными способами	189

<i>Казаков Р.В., Казловский И.С., Зинченко А.И.</i> РНК-конструкция, кодирующая иммуногенный фрагмент шиповидного белка SARS-CoV-2	191
<i>Казловский И.С., Бельская И.В., Казаков Р.В., Юденкова Т.В., Поклонская Н.В., Зинченко А.И., Амвросьева Т.В.</i> Высокопродуктивный синтез основного капсидного белка норовирусов человека в бактериальной системе экспрессии	192
<i>Кудрякова И.В., Афошин А.С., Тарлачков С.В., Леонтьевская Е.А., Галемина И.Е., Руденко П.А., Леонтьевская Н.В.</i> «Омикс»-технологии в действии: поиск бактериолитических ферментов альтернативных антибиотикам	194
<i>Кузнецова А.А., Самсонов В.В., Ростова Ю.Г., Самсонова С.А., Зиятдинов М.Х., Кириухин М.Ю.</i> Поиск и исследование генов, участвующих в метаболизме D-2-гидроксиглутарата в <i>Pantoea ananatis</i>	196
<i>Кулешова Ю.М., Потапович М.И., Титова А.Д., Острикова К.В., Прокулевич В.А.</i> Получение продуцентов интерферона- $\lambda 3$ свиньи на основе бактерий <i>Escherichia coli</i>	198
<i>Манухина О.А., Епишкина Ю.М., Хромова Н.Ю., Шакир И.В., Панфилов В.И.</i> Исследование влияния состава питательной среды на продукцию пиридоксина штаммом <i>Lactobacillus salivarius</i> B-2214	200
<i>Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Шарифов М.Р., Пулатова О.М., Исмаилов Н.Б.</i> Влияние γ -облучения на активность биосурфактантов бактерий рода <i>Rhodococcus</i>	203
<i>Мижева А.А., Фоменко И.А., Машенцева Н.Г.</i> Определение протеолитической активности дрожжей родов <i>Kluyveromyces</i> и <i>Debaromyces</i> для получения биологически активных пептидов в молочной сыворотке	205
<i>Мирзалиева Н.А., Романова М.В., Белодед А.В.</i> Влияние источников углерода и азота на протеолитическую активность термофильных бактерий	207
<i>Мустахимов И.И., Решетников А.С.</i> Модификация метаболизма <i>Corynebacterium glutamicum</i> для анаэробной конверсии лактата в пропионат	209
<i>Нестеренко Л.Е., Попов Р.С., Юрченко Е.А.</i> Изменение условий культивирования морских грибов как способ влияния на продукцию вторичных метаболитов	211
<i>Николайчук В.В., Гецевич Е.О., Куликовская В.И., Ладутько Е.И., Сидоренко А.В.</i> Комплексы на основе нанокompозита альгинат-серебро и энрофлоксацина: получение и свойства	213
<i>Охремчук А.Э., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н.</i> Плазмидные векторы для маркирования клеток грамотрицательных бактерий	215
<i>Петрякова А.Д., Никандрова А.А., Лукьянов Д.А., Закалюкина Ю.В., Бирюков М.В.</i> Антагонистический потенциал актиномицета <i>Streptomyces</i> sp. AP22, выделенного из почвы Ахштырского ущелья	218
<i>Рогожин Е.А.</i> Подходы к выделению антимикробных пептидов микробного и растительного происхождения	220
<i>Семашко Т.В., Жуковская Л.А., Никулина О.К., Яковлева М.Р., Колоскова О.В.</i> Перспективы использования электродиализа в процессе получения ферментного препарата глюкозооксидазы	222
<i>Семашко Т.В., Жуковская Л.А., Пригодская В.И.</i> Процессы микробного синтеза наночастиц и их стабилизации как основа технологий получения новых наноматериалов	224

Федоренчик А.А., Федосова А.А., Алещенкова З.М. Выделение фосфатсолубилизирующих бактерий, продуцирующих индолил-3-уксусную кислоту.....	226
Хмель О.О., Phan Thi Hoai Trinh, Юрченко Е.А., Юрченко А.Н. Вторичные метаболиты морского гриба <i>Penicillium</i> sp. 1901NT-2.53.1.....	228
Хюппенен Е.Д., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н. Конструирование системы редактирования геномов бактерий на основе системы CRISPR/Cas9 <i>Streptococcus thermophilus</i>	230
Чиндарева М.А., Казловский И.С., Зинченко А.И. Создание генетической конструкции для экспрессии рекомбинантной кератиназы <i>Bacillus licheniformis</i> в условиях «холодового шока».....	232
Шагалова В.А., Вустин М.М., Машенцева Н.Г. Поиск аскомицетовых дрожжей из коллекции БРЦ ВКПМ, обладающих наибольшей киллерной активностью.....	234
Шелоник М.А., Гуляева Д.Е., Леонович С.И., Сидоренко А.В. Выделение и характеристика галотолерантных бактерий.....	236
Щетко В.А., Романова Л.В., Макаревич О.В., Гапонова И.И. Оценка эффективности осаждения клеток микроорганизмов при их концентрировании путем центрифугирования в условиях биотехнологического производства.....	238
Юрченко А.Н. Биотехнологический потенциал морских грибов-микромикетов.....	240

Секция 3. Биотехнологии для сельского хозяйства

Abashina T.N., Polivtseva V.N., Suzina N.E., Noskov A.E., Khodakaramyan G., Solyanikova I.P. Prospects of <i>Streptomyces anthocyanicus</i> strain IPS92w against plant pathogens.....	242
Авсиевич Е.И., Лойко И.М., Романова Л.В. Продуктивность и естественная резистентность кроликов при введении в рацион кормовой добавки ДКМ-С.....	244
Аллахвердян В.В., Сидорова Т.М., Асатурова А.М. Влияние штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> на токсигенный гриб <i>Fusarium graminearum</i>	246
Волынчук Н.Н., Кабашикова Л.Ф., Пашкевич Л.В. Влияние дрожжевых грибов на физиолого-биохимические параметры листьев укорененных черенков винограда.....	248
Гапонова И.И., Щетко В.А., Романова Л.В., Макаревич О.В. Динамика накопления полисахаридов молочнокислых бактерий <i>Lactobacillus helveticus</i>	250
Гирилович Н.И., Шмыга Е.Ю., Мандрик-Литвинкович М.Н., Шешко П.С., Коломиец Э.И. Влияние внесения костры льна, обработанной микробным препаратом «Биопродуктин», на микробоценоз приствольных полос яблони в карликовом саду интенсивного типа.....	252
Гырнец Е.Ю., Асатурова А.М. Перспективные штаммы бактерий рода <i>Bacillus</i> с полифункциональными свойствами.....	254
Дайнеко Н.М., Концевая И.И., Тимофеев С.Ф. Оценка влияния микробных биопрепаратов на численность аммонифицирующих бактерий в посевах ячменя.....	256
Дубасова Ю.А., Максимов А.Ю. Применение биофотоники для решения сельскохозяйственных задач.....	258
Ерохин Д.В., Эммер Д.Я., Синельников И.Г., Поплетаева С.Б., Джавахия В.Г. Подходы к изучению механизмов защитного действия белка-индуктора из <i>Pseudomonas fluorescens</i>	260

<i>Журавлева Е.А., Шехурдина С.В., Лайкова А.А., Литти Ю.В.</i> Влияние электропроводящих материалов и диэлектрических аналогов на процесс анаэробного сбраживания сточной воды свинофермы в непрерывных условиях	262
<i>Зайнитдинова Л.И., Лазутин Н.А., Жураева Р.Н., Мавжудова А.М., Эргашев Р.Б., Хегай Т.Б., Рахманова В.Н.</i> Эффективность биогенных наночастиц серебра против некоторых грибов, поражающих растения.....	264
<i>Заяц В.С., Зыль Н.С., Налетов И.В., Пятакова Т.И.</i> Ассоциация агрономически ценных микроорганизмов для улучшения плодородия земель	266
<i>Зимич С. П., Яковлев А. П., Булавко Г. И., Баранов О. Ю., Ботяновская Ю. И., Костюков А. А.</i> Видовое разнообразие грибов в корнях адаптантов <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	268
<i>Зоров И.Н., Рожкова А.М., Доценко А.С., Короткова О.Г., Денисенко Ю. А., Синицын А.П.</i> Ферменты с повышенной термостабильностью для использования в кормовой и пищевой промышленности	270
<i>Кабардин И.К., Меледин В.Г., Лобанов П.Д., Двойнишников С.В.</i> Разработка оптических и ультразвуковых методов исследования многофазных течений для верификации численных расчетов крупнотоннажных биореакторов.....	272
<i>Калацкая Ж.Н., Балюк Н.В., Ламан Н.А., Герасимович К.М., Рыбинская Е.И., Яруллина Л.Г., Цветков В.О.</i> Повышение устойчивости растений картофеля к Y-вирусу при применении <i>Bacillus subtilis</i> 47 в смеси с метилжасмонатом	274
<i>Карташов М.И., Чудакова К.А., Джавахия В.Г.</i> Микробные белки, индуцирующие неспецифическую системную устойчивость растений к болезням: достижения и перспективы использования в сельскохозяйственной практике	276
<i>Картыжова Л.Е., Ананьева И.Н., Клишевич Н.Г., Алещенко З.М.</i> Скрининг азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий, стимулирующих рост и развитие растений сахарной свеклы	278
<i>Касторнов А.А., Петров С.А., Нарушко М.В., Бажин А.С., Субботин А.М.</i> Ультраструктурные взаимоотношения эндофитных бактерий рода <i>Bacillus</i> с корневыми клетками лука <i>Allium cepa</i>	280
<i>Константинов А.В., Хархасова И.А., Пантелеев С.В., Острикова М.Я., Козлова О.В.</i> Получение изолята <i>Coprinellus domesticus</i> через накопительную культуру и изучение особенностей его культивирования как перспективного микоризообразователя	282
<i>Лайкова А.А., Потехина М.А., Литти Ю.В.</i> Стимуляция наночастицами железа процесса темновой ферментации сельскохозяйственных отходов с образованием биоводорода	285
<i>Летвинова В.С., Барейко А.А., Раевская Е.А., Сверчкова Н.В.</i> Выделение спорообразующих бактерий рода <i>Bacillus</i> из микробиома рубца жвачных животных и их идентификация	287
<i>Летвинова В.С., Барейко А.А., Сидоренко А.В., Сверчкова Н.В., Романович Ж.В., Саханчук А.И.</i> Определение доминирующих таксонов микробиоты рубца лактирующих коров..	290
<i>Максимов А.Ю., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимова Ю.Г.</i> Имобилизованные клетки и ферменты бактерий, обладающих гидролитической активностью, для целей сельского хозяйства	292
<i>Маскаленко О.А., Глушков С.М.</i> Разработка систем защиты картофеля в условиях Анапо-Таманской зоны Краснодарского края.....	294

<i>Мороз И.В., Ромашко А.К., Павлюк А.Н., Сенько А.Д., Лобанок А.Г., Сапунова Л.И.</i> «Селекорд-2000» – новый селенсодержащий кормовой продукт для птицеводства яичного направления	296
<i>Найденко И.А., Денисенко В.В., Сафонова М.Е.</i> Бактерии, перспективные для включения в состав препарата для консервирования бобовых трав.....	298
<i>Нековаль С.Н., Глушков С.М., Чурикова А.К., Чернякович М.Н.</i> Первичный скрининг микроорганизмов на нематитидную активность в отношении <i>Meloidogyne</i> spp.	300
<i>Новикова А.С., Проскурнина И.А., Коломиец Э.И., Сверчкова Н.В., Кошак Ж.В.</i> Оценка жизнеспособности и ферментативной активности консорциума бактерий <i>B. amylo-liquefaciens</i> БИМ В-1879 и <i>B. subtilis</i> БИМ В-1878 в составе комбикормов при оптимизации условий влаготепловой обработки и гранулирования	302
<i>Павлова Н.А., Гусенков Е.А., Берестецкий А.О.</i> Влияние гербицидов на рост колоний и прорастание конидий гриба <i>Calophoma complanata</i> – патогена борщевика Сосновского	304
<i>Пилипчук Т.А., Коломиец Э.И.</i> Бактериофаги фитопатогенных бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> : свойства, культивирование, применение.....	307
<i>Проскурнина И.А., Юшко Е.Ю., Летвинова В.С., Лосев О.А.</i> Характеристика штаммов <i>Vacillus velezensis</i> с пробиотическими свойствами, выделенных из микробиоценозов природных водоемов.....	309
<i>Рогожин Е.А.</i> Метаболомное профилирование антимикробных соединений, секретиремых видами рода <i>Vacillus</i> как основа для направленного использования биопрепаратов в защите растений от болезней.....	311
<i>Рожкова А.М., Короткова О.Г., Синельников И.Г., Шашков И.А., Зоров И.Н., Егоров И.А., Егорова Т.В., Сеницын А.П.</i> Получение препарата грибной мурамидазы и его применение при выращивании цыплят-бройлеров.....	313
<i>Рукавцова Е.Б., Захарченко Н.С.</i> Перспективность использования бактерий <i>Vacillus subtilis</i> К-1-1 в качестве биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенов.....	314
<i>Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.</i> Свободноживущие азотфиксирующие бактерии ризосферы пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	316
<i>Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.</i> Штамм ризобий, перспективный для создания биоудобрения под культуру сои (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	318
<i>Стацюк Н.В., Микитюк О.Д., Назарова Т.А., Щербакова Л.А.</i> Микробная деконтаминация сельскохозяйственной продукции, загрязненной фузариотоксинами зearаленоном и деоксиниваленолом.....	320
<i>Степанова Е.С., Кукреш Г.В., Колубако А.В., Николайчик Е.А.</i> Зависимость устойчивости растений <i>Solanum lycopersicum</i> к заражению <i>Pectobacterium versatile</i> от уровня экспрессии гена биосинтеза абсцизовой кислоты NCED3	322
<i>Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А.</i> Кератинолитические свойства нового штамма микровицета <i>Tolypocladium inflatum</i>	324
<i>Шехурдина С.В., Литти Ю.В.</i> Применение пыли системы газоочистки металлургического производства для стимуляции прямого межвидового переноса электронов при анаэробном разложении летучих жирных кислот.....	326

<i>Шмыга Е.Ю., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.</i> Технология производства и преимущества препарата микробного «Биопродуктин» в сухой товарной форме	328
<i>Шруб Е.В., Колубако А.Н., Николайчик Е.А.</i> Поиск мишеней для пектобактериального эффекторного белка DspE в растениях семейства <i>Solanaceae</i>	330
<i>Щепеткова А.Г., Лойко И.М., Скудная Т.М., Сапунова Л.И., Тамкович И.О.</i> Влияние инвертных углеводных подкормок, полученных с использованием ферментной добавки «Апифил», на наполняемость ректума рабочих пчел в период зимовки.....	332
<i>Щербатова Л.А., Рожкова А.М., Синельников И.Г., Микитюк О.Д., Назарова Т.А.</i> Получение и оценка деконтаминационного потенциала рекомбинантных микробных ферментов, детоксицирующих афлатоксин и зеараленон	334

Секция 4. Биотехнологии для медицины и промышленности

<i>Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turaev A.S.</i> Analysis of the relation between the structure and antimicrobial activity of guanidin-containing pectin derivatives.....	337
<i>Gryaznov S., Mender I., Dikmen Z. G., Yilmaz M., Birichevskaya L., Zinchenko A.</i> Telomerase-Driven Telomeric DNA Modification and Immune Activation as Potential Broad-Spectrum Cancer Treatment Platform	338
<i>Абашина Т.Н., Носков А.Е., Вайнштейн М.Б.</i> Биовыщелачивание бактериями силикатной железо-никелевой руды и золотоносного арсенопиритного минерального сырья	340
<i>Алексаночкин Д.И., Крестина Е.А., Фоменко И.А.</i> Технология биотрансформации дрожжевой биомассы с получением пептидов для производства косметических средств.....	342
<i>Алимова Б.Х., Вохидов Х.Т., Пулатова О.М., Махсумханов А.А.</i> Скрининг бактерий рода <i>Acinetobacter</i> продуцентов биоПАВ	344
<i>Амирсаидова Д.А., Бекмуродова Г.А.</i> Определение аутоагрегационной и коагрегационной способности штаммов лактобактерий	346
<i>Антонова Н.П., Горбачева М.А., Вердиев Б.И., Гуцин В.А., Васина Д.В.</i> Получение аэрозоля на основе рекомбинантного противомикробного эндолизина LysECD7-SMAP.....	348
<i>Барботин В.Р., Иванова Л.А.</i> Возможность применения дрожжей <i>Saccharomyces boulardii</i> в качестве пробиотика в составе функционального продукта для профилактики желудочно-кишечных заболеваний	350
<i>Биричевская Л.Л., Ханчевский М.А., Квасюк Е.И., Зинченко А.И.</i> Ферментативный синтез фосфолипидного производного N4-гидроксицитидина	352
<i>Булатовский А.Б., Зинченко А.И., Веялкина Н.Н.</i> Получение и исследование противоопухолевой активности химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» на модели асцитной карциномы Эрлиха <i>in vivo</i>	355
<i>Винтер М.А., Казловский И.С., Зинченко А.И.</i> Получение наночастиц хитозана в комплексе с 3',5'-циклическим диаденозинмонофосфатом.....	357
<i>Волков А.Г.</i> Результаты оценки острой токсичности антибактериального пептидного комплекса из лейкоцитов человека	359
<i>Дегтярев И.А., Фоменко И.А., Иванова Л.А.</i> Применение целлюлолитических ферментных препаратов в технологии получения изолята белка из жмыха рапсового	361

<i>Жданова А.Э., Голубева Д.А., Шаненко Е.Ф., Фоменко И.А.</i> Использование сои в качестве альтернативного сырья в пивоваренной промышленности	363
<i>Зинченко А.И., Биричевская Л.Л., Казловский И.С., Булатовский А.Б., Винтер М.А.</i> Некоторые новые подходы к терапии онкологических заболеваний.....	365
<i>Иванов О.А., Василевская Е.Д., Строгова А.А., Шишло А.В., Шевцов Н.А.</i> Антибактериальная активность папаиновых гидролизатов пшеничной муки.....	368
<i>Ишемгулов А.Т., Летута С.Н.</i> Оценка жизнеспособности планктонных бактерий при импульсном возбуждении в присутствии сенсibilизаторов	370
<i>Капустина Ю.М., Рубаник Л.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П.</i> Использование ПЦР для обнаружения хламидий и хламидияподобных микроорганизмов в респираторных образцах.....	372
<i>Крестина Е.А., Алексаночкин Д.И., Фоменко И.А., Шаненко Е.Ф.</i> Биотехнологические способы повышения экстрактивности чая.....	374
<i>Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Годовалов А.П.</i> Возможности генерации зрелых дендритных клеток с применением иммуномодулятора бактериального происхождения.....	376
<i>Левчук О.Д.</i> Глицеролселективные ферменты для детекции глицерола.....	378
<i>Павлова Е. В., Соляникова И. П.</i> Рекомбинантные моноклональные антитела, полученные методом фагового дисплея, угнетают синтез коллагена нормальными фибробластами человека	380
<i>Павлюченко И.В., Фоменко И.А.</i> Технология получения экстракта из биомассы хлореллы, культивируемой в условиях <i>in vitro</i>	382
<i>Попович С.А., Бунеева Е.А., Лепехина О.В. Рябова А.С., Арзуманова А.Р., Толкачева А.А., Черенков Д.А.</i> Разработка ферментной технологии получения кератина разной степени гидролиза из отходов птицеводства	384
<i>Саидова И.М., Маматраимова Ш.М., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Махсумханов А.А.</i> Скрининг молочнокислых бактерий – продуцентов биосурфактантов	385
<i>Сапунова Л.И., Шепишелев А.А., Мартынова Е.А.</i> Ферментативный гидролиз кека спиртовой барды	387
<i>Сармурзина З.С., Абитаева Г.К., Бисенова Г.Н., Мусабаева Б.К., Найманов Е.Н.</i> Разработка напитков профилактического назначения, обогащенных пробиотиками, пребиотиками, витаминами и минералами.....	390
<i>Сафонова М.Е., Найдено И.А., Денисенко В.В., Головнева Н.А.</i> Выделение молочнокислых бактерий из ржаных хлебных заквасок спонтанного брожения.....	392
<i>Сверчкова Н.В., Тригубович А.М., Ванькевич Н.А., Коломиец Э.И., Проскурнина И.А., Ковальская Д.С.</i> Характеристика штаммов <i>Vacillus atyloliquefaciens</i> БИМ В-1828 Г и <i>V. atyloliquefaciens</i> БИМ В-1829 Г – пробиотического компонента моющего средства с дезинфицирующим эффектом	394
<i>Сидоренко А.В., Савич В.В., Красковский А.Н., Гилевская К.С., Куликовская В.И., Ахмедов О.Р.</i> Получение полимерных материалов с иммобилизованными бактериофагами, перспективных для лечения ран.....	396
<i>Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Цурикова Н.В., Костылева Е.В., СерEDA А.С., Великорецкая И.А.</i> Создание штаммов – продуцентов технических ферментов	398

<i>Скиба Е.А.</i> Биотехнологическая трансформация мискантуса гигантского.....	399
<i>Скиба Е.А., Будаева В.В.</i> Интегрированная технология переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в востребованные продукты.....	401
<i>Шавыркина Н.А.</i> Влияние биологически активных веществ растительного сырья на биосинтез бактериальной наноцеллюлозы	403
<i>Шавыркина Н.А.</i> Фундаментальные подходы получения биопродуктов из мискантуса для снижения углеродного следа	405
<i>Шешичев А.А., Сапунова Л.И., Ерхова Л.В., Глушень Е.М., Соловей В.И.</i> Микробные технологии в переработке послеспиртовой барды	407
<i>Щетко В.А., Романова Л.В., Гапонова И.И., Макаревич О.В., Головнева Н.А., Сафонова М.Е., Самарцев А.А.</i> Основы безотходной технологии получения микробных пробиотических препаратов.....	409

Секция 5. Природоохранные биотехнологии

<i>Акатова Е.В., Абацева М.А.</i> Влияние различных концентраций нефти и нефтепродуктов на рост новых штаммов-деструкторов	412
<i>Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Маркова Ю.А.</i> Комплексный подход к созданию новых микробных препаратов для биоремедиации техногенно нарушенных почв	414
<i>Бирюков Р. Н., Глушень Е. М.</i> Эффективность применения препарата «Бионейт» для сточных вод, осложненных высоким содержанием хлорсодержащих дезинфицирующих средств	416
<i>Гниненко Ю.И., Цуканов Я.В., Алпацкая Ю.И., Галич Д.Е., Банникова О.</i> Место биотехнологий при защите леса от майского хруща	418
<i>Губчик К.А., Глушень Е.М., Чирикова М.С., Бирюков Р.Н.</i> Очистка сточных вод птицеперерабатывающих предприятий с использованием консорциума бактерий рода <i>Rhodococcus</i> и <i>Vacillus</i>	420
<i>Жебрак И.С., Ковальская Е.М.</i> Мультиреспирометрическое тестирование торфяной почвы.....	422
<i>Жебрак И.С., Лецевич А.В.</i> Микоризные ассоциации <i>Ledum palustre</i> в болотных сосняках	424
<i>Иминова Л.Р., Поливцева В.Н.</i> Биотехнологический потенциал новых почвенных изолятов – высокоэффективных деструкторов нефти и фенола.....	426
<i>Клишевич Н.Г., Самсонова А.С., Картыжова Л.Е.</i> Бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов – деструкторов нефтяных углеводородов	428
<i>Косимов Д.И., Зайнитдинова Л.И., Лазутин Н.А., Жураева Р.Н., Мавжудова А.М., Эргашев Р.Б., Хегай Т.Б.</i> Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов из почв антропогенных зон	430
<i>Кочаровская Ю.Н., Богун А.Г., Демин Д.В., Севостьянов С.М., Делеган Я.А.</i> Разнообразие архей в почвогрунтах, загрязнённых лигнинсодержащими отходами	432
<i>Кузьмицкая А.А., Тихонова П.С., Калёнов С.В.</i> Применение адаптивной лабораторной эволюции в изучении микроорганизмов – биодеструкторов полиэтилентерефталата	434

<i>Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г.</i> Биодegradация линейных полиакриламидов амидазо- содержащими бактериями	436
<i>Наркевич Д.А., Глушень Е.М.</i> Влияние различных факторов на утилизацию бутилцелло- зольва на примере бактерий <i>Rhodococcus opacus</i> VOC-14.....	438
<i>Наумович Н.И., Ананьева И.Н., Алещенкова З.М., Сафронова Г.В., Федоренчик А.А.</i> Выде- ление бактерий, обладающих комплексом агрономически ценных свойств, для повыше- ния стрессоустойчивости растений при водном дефиците.....	440
<i>Никанова Д.А., Артемьева О.А., Колодина Е.Н., Бровко Ф.А., Соколов С.Л., Зиновье- ва Н.А.</i> Биологическое разнообразие микробного сообщества и гены вирулентности <i>Staphylococcus aureus</i> , выделенного из молока коров	442
<i>Позднякова Н.Н., Шиповская А.Б., Бабицева Т.С., Турковская О.В.</i> Трансформация искус- ственных и синтетических полимеров аскомицетами.....	444
<i>Пономарева А.Л., Еськова А.И.</i> Применение микроорганизмов, способных к аэробной и анаэробной деградации углеводов для очистки нефтезагрязненных сред	446
<i>Пономарева О.Н., ЛыонгТхи Мо, Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Сузина Н.Е., Филонов А.Е.</i> Биодegradация углеводов родококками: утилизация гексадекана в разном агрегат- ном состоянии в зависимости от температуры среды.....	448
<i>Севницкая Н.Л.</i> Разработка биологического препарата «ИПСБОВЕР» для защиты хвой- ных насаждений от стволовых вредителей	450
<i>Суворов Д.А., Вакар Л.Л., Кузнецов А.Е.</i> Перекрестная адаптация микроорганизмов ак- тивного ила к УФ-обеззараживанию в условиях оксидативного воздействия	452
<i>Сыровацкая Г. А., Максимова Ю. Г.</i> Физиолого-биохимические свойства алкалоле- рантных нитрилгидролизующих родококков	454
<i>Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А., Айткельдиева С.А., Смирнова И.Э., Баймаханова Г.Б.</i> Разработка биопрепарата на основе термотолерантных нефтеокисля- ющих микроорганизмов.....	456
<i>Шавела Ю.В., Глушень Е.М.</i> Устойчивость бактерий <i>Rhodococcus</i> sp. G13 к неблагопри- ятным условиям среды	458
ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ	460

Секция 1

**Физиология, биохимия и генетика
микроорганизмов**

***Erwinia* phage tail-like bacteriocins**

Besarab N.V.¹, Hrusha P.A.¹, Romaniuk L.V.², Zlatohurska M.A.², Tovkach F.I.²,
Evtushenkov A.N.¹

¹*Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

e-mail: natal-vasilna@rambler.ru

²*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, D03680 Kyiv, Ukraine*

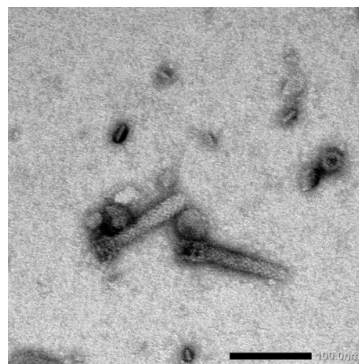
Bacteriocins are antimicrobial protein compounds synthesized by bacteria. Due to their diversity and specificity of action, bacteriocins are used in biotechnology, industry and pharmacy [1]. There is a group of bacteriocins that have a similarity of structure or evolutionary relationship with tails of bacteriophage particles. Such phage tail-like bacteriocins (PTLBs) are divided into two classes: the R-type PTLBs, related to myovirus contractile phage tails, and the F-type PTLBs, related to siphovirus noncontractile phage tails [2]. Because of the high potential of PTLBs for the control and typing of bacteria, the study and detailed characterization of PTLBs biology is of acute importance.

Representatives of the genus *Erwinia* are economically significant plant-pathogenic and plant-associated bacteria. For a number of members of the genus, the bacteriocins were described [3], including potential bacteriocins of phage origin [4]. Here we announce the phenomenon of the formation of a large number of separate phage tails in lysates of *Erwinia amylovora* bacteriophage Henal [5], which are of interest as novel potential PTLBs.

For examination of Henal with TEM, we prepared virus particle concentrates as follows. We treated phage lysate with DNAase and RNAase and concentrated by adding 10 % (w/v) PEG. Further phage particles were sedimented by ultracentrifugation and resuspended in STM buffer. Henal samples were stained with uranyl acetate (2 % w/v) on collodion-coated copper grid. Using Jeol JEM-1400 TEM we established that bacteriophage Henal is a myovirus. During the TEM analysis of bacteriophage Henal samples, we found a significant proportion of individual phage tails (sh. figure).

Bacteriophage tails in lysates are a common feature of phage assembly defects resulting from abortive infection. We undertook primary studies to establish the stability of viral particles obtained after infection of the host bacteria *E. amylovora* 1/79Sm and the effect of the bacterial strain used on the reproduction of the virus. When studying the Henal efficiency of plating using three susceptible bacterial strains (*E. amylovora* 1/79Sm, L 3–6, L 3–8), we did not find a statistically significant strain-specific difference in the infection efficiency. To study the effect

of osmotic shock on the destruction of viral capsids, we conducted bacteriophage Henal incubation in distilled water after being in high-concentration NaCl solutions. We also did not observe changes in the titer of bacteriophages under the influence of changes in osmotic pressure.



The electron micrograph of tails in lysate of *E. amylovora* bacteriophage Henal

Bacteriocin-like structures of a phytopathogenic bacterium *E. amylovora* are currently unexplored, and therefore the observations obtained are of interest for further research and characterization.

Acknowledgments. We would like to thank Maksim S. Kharchuk, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, for help with TEM analysis.

References

1. Simons, A. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria / A. Simons, K. Alhanout, R.E. Duval // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, № 5. – P. 639.
2. Scholl, D. Phage tail-like bacteriocins / D. Scholl // *Annu Rev. Virol.* – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 453–467.
3. Lysak, V.V. Induction of bacteriocins synthesis by *Erwinia* cell / V.V. Lysak, Yu.K. Fomichev // *Antibiotics*. – 1982. – № 3. – P. 165–170. (In Russian)
4. Experimental evidence for proteins constituting virion components and particle morphogenesis of bacteriophage ZF40 / N. Korol [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2016. – Vol. 363, № 6. – P. fnw042.
5. Isolation and characterization of Henal – a novel *Erwinia amylovora* bacteriophage / N.V. Besarab [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2020. – Vol. 367, № 9. – P. fnaa070.

A novel temperate *Erwinia amylovora* bacteriophage Stean

Besarab N.V.¹, Letarov A.V.², Belalov I.S.², Golomidova A.K.², Kulikov E.E.², Babenko V.V.³, Ivanova K.V.¹, Besarab S.V.⁴, Evtushenkov A.N.¹

¹Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: natal-vasilna@rambler.ru

²Winogradsky Institute of microbiology, Research center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

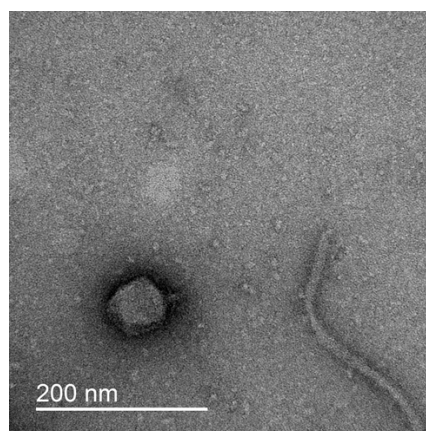
³Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency

⁴Independent researcher, Belarus, RG: Siarhei-Besarab, IN: steanlab, eL: 654223

Fire blight, a severe fruit tree disease, is caused by a Gram-negative *Erwinia amylovora* bacterium. The overall trend towards minimization of usage of antibiotics in agriculture suggests using *E. amylovora* bacteriophages for plant pathogen biocontrol [1–3]. One of the prerequisite features of a control bacteriophage is a strictly lytic reproduction cycle, so no lateral gene transfer would be possible due to phage infection. The interest of researchers is biased towards lytic phages, then, and until now there is very limited information on temperate *E. amylovora* bacteriophages [4, 5]. Here we present a data on *E. amylovora* temperate bacteriophage, according to its genome annotation.

We isolated *E. amylovora* bacteriophage Stean from the soil sample taken under an apple tree in June 2018 in Gomel, Belarus. The bacterial strain *E. amylovora* 1/79 Sm (Germany, 1979) was used for isolation and propagation of bacteriophage.

Using JEOL JEM 2100 TEM we established that bacteriophage Stean is a podovirus with a head of $69 \pm 2,7$ nm (sh. figure).



The electron micrograph of *E. amylovora* bacteriophage Stean

We studied the host range of phage Stean using double agar overlay assay on Petri dishes, the results presented in the table. Phage Stean was able to form plaques on all studied strains of phytopathogen as well as on the strain of *Pantoea agglomerans*.

Stean genomic DNA was isolated from bacteriophage lysate using phenol-chloroform extraction and sequenced using an Ion Torrent Proton sequencer system (Applied Biosystems, USA). The primary assembly was performed using Newbler version 2.9. The coverage was x80. The complete genome sequence of Stean was deposited in NCBI GenBank (OP743926.1). The double-stranded DNA genome of Stean consists of 61 112bp and has 61.9 % GC content. Sequence similarity searches using blastn (the viruses nucleotide collection) revealed that Stean has sequence identity with *Erwinia* phage PEp14 (Query Cover 98 %, Per. ident 87.98 %) and *Erwinia* phage Pavtok (Query Cover 91 %, Per. Ident 90.73 %). It is known that genome of temperate bacteriophages commonly possesses genes of integrase, repressor, antirepressor, excisionase [6]. Functional annotations of Stean genome using NCBI BLASTx searches located a gene of integrase (GenBank: UZV40798.1). Integrases provide site-specific recombination between sequences *attP* and *attB*. Further experiments are planned to study the lysogenization of bacteria *E. amylovora* by Stean phage to assess its potential role in plant pathogen evolution and modification.

Host range of *E. amylovora* bacteriophage Stean

<i>E. amylovora</i> phage	<i>E. amylovora</i> strain										<i>P. agglomerans</i> strain
	1/79Sm	E2	E3	E4	E5	L-3-1	L-3-5	L-3-6	L-3-8	133/95	220
Stean	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

References

1. Characterization of Myoviridae and Podoviridae family bacteriophages of *Erwinia amylovora* from Hungary – potential of application in biological control of fire blight / I. Schwarczinger [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2017. – Vol. 149. – P. 639–652.
2. Isolation of Nine Bacteriophages Shown Effective against *Erwinia amylovora* in Korea / J. Park [et al.] // Plant Pathol. J. – 2022. – Vol. 38, № 3. – P. 248–253.
3. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada / J. Boulé [et al.] // Can. J. Plant Pathology. – 2011. – Vol. 33, № 3. – P. 308–317.
4. Erskine, J.M. Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight / J.M. Erskine // Can. J. Microbiol. – 1973. – Vol. 19, № 7. – P. 837–845.
5. Absence of lysogeny in wild populations of *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans* / D.R. Roach [et al.] // Microb. Biotechnol. – 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 510–518.
6. Characterization of the relationship between integrase, excisionase and antirepressor activities associated with a superinfecting Shiga toxin encoding bacteriophage / P.C. Fogg [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39, № 6. – P. 2116–2129.

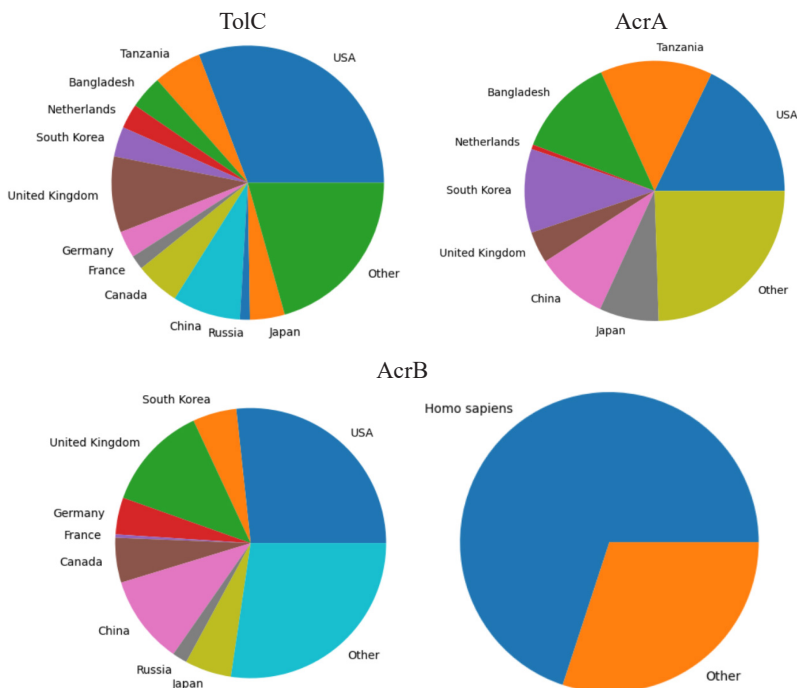
Sequence- and structure-based computational protein analysis of the MDR pump AcrAB-TolC from *Escherichia coli* in context of antibacterial action of substances

Karakozova M.V., Raldugina V.N., Nazarov P.A.

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: mvk752002@gmail.com

Multidrug-resistance (MDR) pumps are the cornerstone of protecting bacteria from antibiotics. MDR pumps form the basis of non-specific protection of bacteria and belong to six families of MDR pumps. One of the best studied MDR pumps is the *E. coli* AcrAB-TolC pump.

The study of pump sequences is an important task in understanding the processes of formation of new clinical isolates-superbugs, since resistance due to efflux occupies an important place in the total number of resistant bacteria arising as a result of antibiotic therapy. It is believed that the genes encoding MDR pumps are variable and belong to the so-called “luxury” genes, i. e., they are designed to adapt bacteria to changing environmental conditions.



Distribution of the examined TolC, AcrA and AcrB protein sequences by country.
 Distribution of the considered TolC protein sequences in the host organism

Analysis of laboratory strains showed that the sequences of a large number of laboratory strains used (K-12 and B) are conserved and do not detect any mutation in the amino acid sequences. The conservatism of amino acid sequences of the pumps resembles the conservatism of the “housekeeping” genes, which indicates the great importance of these genes for bacteria, despite the fact that these genes are formally classified as nonessential genes.

This work was supported by grant from the Russian Science Foundation 22-15-00 099 (Creation of a heterologous MDR pump system for studying bacterial resistance of pathogenic gram-negative bacteria).

The role of TolC-containing MDR pumps in pumping out the main antibiotics

Abdul Bari Md.^{1,2}, Nazarov P.A.²

¹ *Moscow Institute of Physics & Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russia, e-mail: mbgbari2017@gmail.com*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Multidrug Resistance (MDR) pumps a process where molecules, especially in antibiotics are pumped from inside bacterial cells to outside; this done by molecular machines called efflux pumps. The study in the experiment the role of TolC-containing MDR pumps, more clearly the AcrAB-TolC pump, the main pump of *Escherichia coli*; to investigate wild type and different deletion mutants of MDR pumps by using various sub-lethal concentrations and incubation times with antibiotics & chemical compounds.

The *E. coli* AcrAB-TolC MDR efflux pump complex consists of AcrB, which represents Inner membrane protein (IMP) and recognizes substrates and utilizes the proton motive force (pmf) for substrate translocation. TolC, which represents the outer membrane protein (OMP) channel and facilitates the expulsion of substrates from the cell. AcrA, which represents a periplasmic adapter protein (PAP) and links AcrB and TolC and acts to safeguard the transport of the captured substrate across the periplasm. Each subunit of the transporter is an integral part of the efflux machinery. [1] MDR pumps are involved in resistance to antibiotics with any mechanism of action and protect bacteria even against those antibiotics for which they do not have specific resistance mechanisms [2].

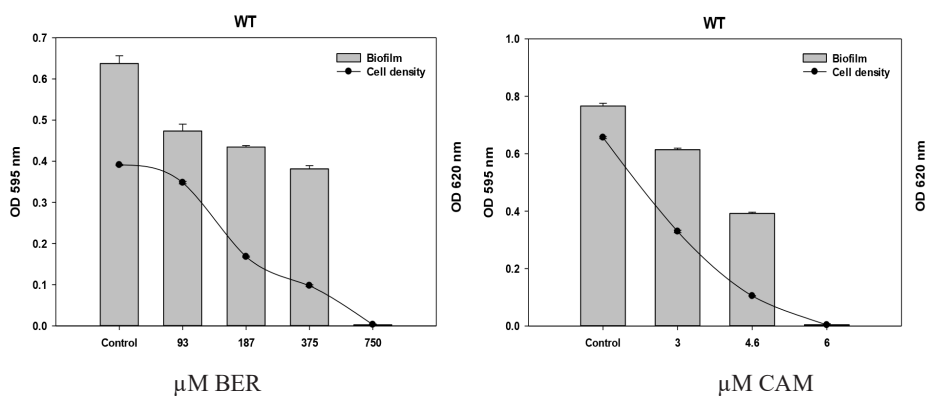
The resistance of bacteria in the biofilms (in form of MIC) can exceed the resistance of planktonic forms by two orders of magnitude. The formation of biofilms includes several stages: (1) reversible attachment of planktonic cells to the surface, (2) cell proliferation and formation of microcolonies, (3) transformation of colonies into clusters of multi-layer cell formations synthesizing extracellular polymeric substances (EPS), that form a matrix, (4) maturation of the biofilm with the transition of some cells to the planktonic form for the formation of new colonies [2].

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for chloramphenicol (CAM), Berberine (Ber), Beberine-C6 derivative were determined by using 2-fold broth microdilution method. The compounds were diluted in a 96-well microtiter plate to final concentrations ranging from 0.4 to 5000 μM in a 200- μL aliquot of the bacterial suspension, followed by incubation at 37 °C for 18 h. The following strains of bacteria were used: *E. coli* K-12 MG1655. The MIC were determined as the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth. The bacterial growth was observed visually alongside OD measurements [3].

MIC value of WT and deletion mutants of *E. coli*

Mutants	CAM (1 mg/ml)	Ber (10mM)	Ber-C6 (10mM)
TolC	1.5 μ M	250 μ M	50 μ M
AcrB	1.5 μ M	350 μ M	150 μ M
AcrD	3 μ M	750 μ M	>5000 μ M
AcrF	3 μ M	750 μ M	>5000 μ M
MacB	3 μ M	750 μ M	>5000 μ M
MdtB	3 μ M	750 μ M	>5000 μ M
MdtE	3 μ M	750 μ M	>5000 μ M
EmrB	4 μ M	750 μ M	>5000 μ M
EmrY	4 μ M	750 μ M	>5000 μ M
Wild type (WT)	6 μ M	750 μ M	>5000 μ M

To assess how compounds affect biofilm formation, modified the protocol [4] and evaluated the effects of a substance on biofilm formation as a change in the ratio of planktonic and sessile forms of bacteria. The microbial biofilms were cultivated in LB media in polystyrene 96-well plates (Citotest, Haimen, China). Panels of test substances were prepared by the method of double dilutions, 200 μ L of which was added to each well. Antibiotics were not added to control samples; *E. coli* K-12 MG1 655 cell suspension (5×10^5 cells per mL) was added to each well. Microtiter plates were incubated at 37 °C in a Thermo Scientific Multiskan FC plate reader with an incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 h. Bacterial growth was observed by means of OD620 measurements each hour. After incubation, the liquid media was discarded by inverting the plate upside down to dump the cell suspension, and the plate was triply washed with PBS buffer to remove loose cells. To fix the remaining biofilms, the plates were placed in a thermostat at 60 °C for 30 min. To stain biofilms, 40 μ L of 1 % crystal violet was added to each well and left to stain for 30–60 min. The crystal violet was discarded, and the plate was washed twice with DI water, and then 200 mL of 95 % ethanol was added into each well to extract the crystal violet. Measurement of the absorbance of crystal violet was performed at 595 nm using the microplate reader (sh. figure) [5].



This work is supported by grant #22-15-00 099 from the Russian Science Foundation (RSF).

References

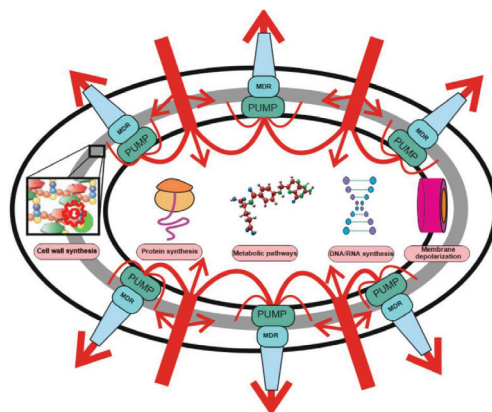
1. Alenazy, R. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli* / R. Alenazy // *Biology*. – 2022. – № 11 (9). – P. 1328. doi: [org/10.3390/biology11091328](https://doi.org/10.3390/biology11091328)
2. Nazarov, P.A. MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages / P.A. Nazarov // *Antibiotics*. – 2022. – № 11. – P. 734. doi: [org/10.3390/antibiotics11060734](https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734)
3. Conjugates of Chloramphenicol Amine and Berberine as Antimicrobial Agents / J.A. Pavlova [et al.] // *Antibiotics*. – 2023. – № 12. – P. 15. doi: [org/10.3390/antibiotics12010015](https://doi.org/10.3390/antibiotics12010015)
4. Effect of Metabolic Uncoupler, 3, 30, 40, 5- Tetrachlorosalicylanilide (TCS) on *Bacillus Subtilis*: Biofilm Formation, Flocculability and Surface Characteristics / X.-C. Feng [et al.] // *RSC Adv*. – 2018. – № 8. – P. 16178–16186. doi: [org/10.1039/c8ra02315h](https://doi.org/10.1039/c8ra02315h)
5. Mitochondria-Targeted Antioxidants as Highly Effective Antibiotics / P.A. Nazarov [et al.]. *Sci. Rep.* – 2017. – № 7. – P. 1394. doi: [org/10.1038/s41598-017-00802-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00802-8)

Multidrug resistance pumps as a keystone of bacterial resistance: new approaches

Nazarov P.A., Noskov S., Abdul Bari Md., Raldugina V.N., Karakozova M.V.

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: nazarovpa@gmail.com

Antibiotic resistance is a global problem of modern medicine. A harbinger of the onset of the postantibiotic era is the complexity and high cost of developing new antibiotics as well as their inefficiency due to the rapidly developing resistance of bacteria. Multidrug resistance (MDR) pumps, involved in the formation of resistance to xenobiotics, the export of toxins, the maintenance of cellular homeostasis, and the formation of biofilms and persistent cells, are the keystone of bacterial protection against antibiotics. MDR pumps are the basis for the nonspecific protection of bacteria, while modification of the drug target, inactivation of the drug, and switching of the target or sequestration of the target is the second specific line of their protection. Thus, the nonspecific protection of bacteria formed by MDR pumps is a barrier that prevents the penetration of antibacterial substances into the cell, which is the main factor determining the resistance of bacteria. Understanding the mechanisms of MDR pumps and a balanced assessment of their contribution to total resistance, as well as to antibiotic sensitivity, will either seriously delay the onset of the postantibiotic era or prevent its onset in the foreseeable future (sh. figure).



Two-level protection of bacteria from antibiotics: the role of MDR pumps in antibiotic resistance

This work was supported by grant from the Russian Science Foundation 22-15-00 099 (Creation of a heterologous MDR pump system for studying bacterial resistance of pathogenic gram-negative bacteria).

Получение рекомбинантного белка Hfq *Pseudomonas putida* BS3701 в гетерологичной экспрессионной системе

Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия,
электронный адрес: tanechka2576@yandex.ru*

Hfq – РНК-связывающий белок, ортологи которого обнаружены и у грам-отрицательных, и у грамположительных бактерий. Шаперон Hfq способен защищать от деградации малые регуляторные РНК и стабилизировать комплекс нкРНК-мРНК, что делает его важным компонентом *in vitro* исследований РНК-РНК дуплексов. Цель работы – конструирование штамма-продуцента рекомбинантного белка Hfq.

С помощью сервера SyntTax (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/SyntTax/>) в штамме *Pseudomonas putida* BS3701 был идентифицирован ортолог шаперона (GenBank: QLJ14858.1), в качестве референсной последовательности использовали аминокислотную последовательность Hfq штамма *E. coli* K12 (P0A6X3 в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot). Нуклеотидная последовательность гена *hfq* была клонирована в плазмидных векторах pQE30 и pQE60. Вектора pQE30 и pQE60 компании QIAGEN содержат последовательность, кодирующую 6 гистидинов на N- и C-конце белка, соответственно, что позволяет получить рекомбинантный белок в одну стадию с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Для проведения клонирования плазмиды гидролизовали по сайтам BamHI/HindIII и BamHI/BglIII (pQE30 и pQE60, соответственно), фрагмент ДНК, содержащий ген *hfq*, амплифицировали с помощью полимеразы Q5 и специфических праймеров, которые были дополнены с 5'-конца перекрывающимися с вектором фрагментами длиной 20 нуклеотидов. Для конструирования рекомбинантных плазмид использовали метод T5 exonuclease DNA assembly (TEDA).

Штамм *E. coli* M15[pREP4] трансформировали рекомбинантными плазмидами pQE30_hfq и pQE60_hfq и выращивали в условиях индукции синтеза белка. Синтез белка наблюдали только в штамме *E. coli* M15[pREP4] [pQE30_hfq].

Работа поддержана грантом РНФ № 22-24-01138, <https://rscf.ru/project/22-24-01138/>.

Перспективы метагеномных подходов в анализе почвенной микробиоты в фундаментальной и прикладной науке

Андронов Е.Е.

*Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Пушкин, Россия,
электронный адрес: eeandr@gmail.com*

В начале XXI века в почвенной микробиологии произошел радикальный поворот к методам, основанным не на культивировании микроорганизмов, а на анализе пулов нуклеиновых кислот, выделенных из почвы. Одной из главных особенностей таких данных явилось то, что оценка численности микроорганизмов, обитающих в почве, выросла на 2–3 порядка по сравнению с традиционными методами учета, основанными на использовании питательных сред (хотя, к этому времени многие уже забыли, что именно такую оценку, основанную на прямом учете, давал С.Н. Виноградский 100 лет назад). Второе открытие заключалось в том, что основная масса этих микроорганизмов не растет на лабораторных питательных средах и относится, таким образом, к «некультивируемой» почвенной микробиоте. Более 20 лет коллективных поисков с использованием метагеномных подходов позволяют сделать некоторые выводы относительно состояния и перспектив этих поисков в фундаментально и практически ориентированных исследованиях. И если в первой части обстановка выглядит весьма оптимистично и обещает оставаться такой еще долгие годы, то во второй, практически ориентированной части, все не так радужно. Несмотря на то, что стоимость анализа с использованием метагеномных подходов снизилась, интерпретация данных и, более того, формирование практических рекомендаций остаются весьма проблематичными. Как выразилась одна исследовательница в области геномной биологии, «1 000 \$ genome, 100 000 \$ interpretome».

Работа поддержана грантом РНФ 23-16-00 147.

Встречаемость грибов рода *Aspergillus* среди микромицетов – агентов биоповреждений материалов и контаминантов пыли

Арашкова А.А.¹, Летвинова В.С.¹, Тригубович А.М.²

¹Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь, электронный адрес: arashkova.mycology.by@gmail.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Быстрый рост, широкая амплитуда изменчивости и лабильный метаболизм обеспечивает широкое распространение и обилие микроскопических мицелиальных грибов как в природе, так и в антропогенных биоценозах [1]. Увеличению разнообразия микромицетов, вызывающих биоповреждения различных объектов, способствует нарушение условий эксплуатации помещений и применение негрибостойких материалов [2]. Положительное воздействие пылевых частиц на микобиоту воздуха помещений обусловлено дополнительным источником питания и защитой от неблагоприятных воздействий, например, УФ-излучения [3]. Актуальность исследований по оценке встречаемости грибов рода *Aspergillus* в очагах плесневого поражения материалов и в пыли помещений различного назначения вызвана опасностью представителей данной группы грибов для здоровья людей, особенно лиц с ослабленным иммунитетом или чувствительностью к аллергенным и токсигенным факторам микромицетов [1].

Объектом исследования служили микромицеты, выделенные из очагов плесневого поражения и пылевых скоплений в жилых помещениях (квартиры, общежития), общественных учреждениях (архивы, музеи), а также из проб, привезенных белорусскими полярниками из модулей Антарктических станций.

На основании изучения культурально-морфологических и микроскопических признаков изолятов рода *Aspergillus* установлено, что 119 культур, выделенных из пыли, относятся к 11 видам (*A. amstelodami*, *A. calidoustus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. roseoglobulosus*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*), 122 культуры, выделенные из очагов биоповреждений, – к 13 видам (*A. calidoustus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. puniceus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*).

Среди 129 проб пыли и 178 проб строительных материалов с признаками биоповреждений, относительная численность видов рода *Aspergillus* в пыли жилых помещений составляет 44,3 %, музеев и архивов – 32,6 и 62,1 %, соответственно, в пробах пыли, привезенных из модулей Антарктических станций – 29,7 % (рис. 1), встречаемость видов рода *Aspergillus* в очагах плесневого

поражения жилых и общественных помещений составляет 57,4 %, музеев и архивов – 20,4 и 72,1 % соответственно, Антарктических станций – 6,7 % (рис. 2).

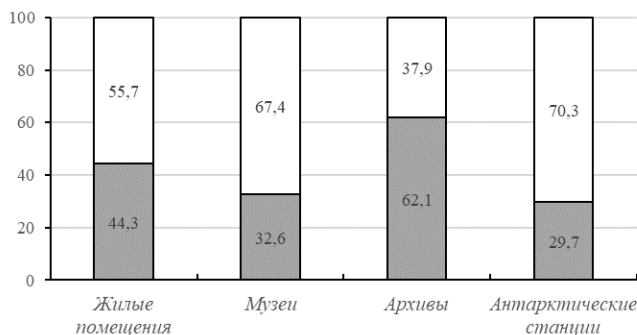


Рис. 1. Доля (%) представителей рода *Aspergillus* (■) от общего состава микромицетов (□), выделенных из проб пыли

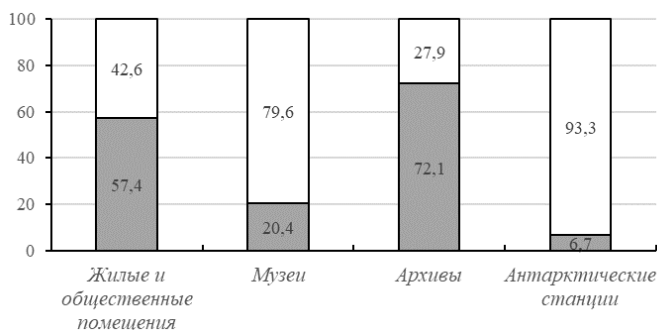


Рис. 2. Доля (%) представителей рода *Aspergillus* (■) от общего состава микромицетов (□), выделенных из пораженных строительных материалов

Широкое видовое разнообразие грибов рода *Aspergillus* в пылевых налетах и очагах плесневого поражения жилых и общественных помещений различных климатических регионов свидетельствует о высоком адаптационном потенциале указанных микромицетов и является фактором риска для здоровья людей.

Список использованных источников

1. Сравнительная оценка воздействия некогерентного импульсного и ультрафиолетового излучений на ростовые и биохимические показатели микромицетов-деструкторов / Д.В. Кряжев [и др.] // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2013. – № 5 (1). – С. 136–140.
2. Биоповреждения и защита синтетических полимерных материалов / Е.Л. Пехташева [и др.] // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2012. – № 10. – С. 166–173.
3. Корнейкова, М.В. Условно-патогенная микобиота пыли в городах разных климатических зон на примере Мурманска и Москвы / М.В. Корнейкова, А.С. Сошина, О.В. Гавричкова // Микология и фитопатология. – 2021. – Т. 55, № 4. – С. 256–270.

Сравнительный анализ структуры нормального и мутантного белка MAPEG-семейства у *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Бондарева К.С., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П.

Биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, Беларусь, электронный адрес: bkristinasav@yandex.ru

Белки семейства MAPEG (от англ. «Membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism») на основании своей ферментативной активности относятся к классу глутатион-трансфераз и обнаружены в клетках всех живых организмов. MAPEG задействованы в метаболизме производных арахидоновой кислоты, а также биотрансформации и детоксикации элетрофильных субстратов при участии восстановленной формы глутатиона. В условиях *in vivo* функционально активной является гомотримерная форма белка. Каждый из мономеров состоит из четырех трансмембранных α -спиралей, обеспечивающих закрепление в мембране и взаимодействие соседних мономеров друг с другом. α -спиральные участки соединены между собой при помощи внемембранных петлевых доменов различной длины [1, 2].

Анализ генома штамма дикого типа и мутантного штамма B-162/15 бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* продемонстрировал, что у мутанта в последовательности, кодирующей белок MAPEG, формируется преждевременный стоп-кодон, что приводит к укорочению белка на 28 а. к. Поскольку продукт данного гена задействован в детоксикации редокс-активных соединений, потенциально возможно, что данные изменения могли оказать влияние на способность мутанта к продукции редокс-активных феназиновых антибиотиков.

Анализ белковой последовательности MAPEG мутантного штамма и штамма дикого типа (B-162) показал, что оба белка имеют высокую степень гомологии с микросомальной простогландин-Е-синтазой 1 (3dww). Дальнейшее 3D-моделирование с помощью онлайн-ресурса I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) подтвердило, что данный белок может быть использован в качестве референса.

Формирование стоп-кода у мутанта привело к исчезновению из структуры белка 4-й α -спирали и существенному укорочению 3-й α -спирали (см. рисунок).

Данные спирали ответственны за закрепление мономера в мембране и за взаимодействие мономерных субъединиц друг с другом. Это указывает на то, что мутантный белок потенциально может изменить свою внутриклеточную локализацию.



Сравнение 3D-структур нормального (а) и мутантного белка (б)

Укорочение белка не затронуло активные сайты связывания глутатиона (R50 и Y96), которые согласно данным 3D-моделирования имеют сходную локализацию у референсной формы и исследуемых бактериальных MAREG. Однако результаты молекулярного докинга демонстрируют, что ключевыми сайтами связывания глутатиона у штамма В-162 являются аминокислотные остатки (R50, Y90, S109). У мутантной формы белка штамма В-162/15 оптимальные сайты связывания локализуются в иных точках – T92, R93.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hebert, H. The structure of membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism as determined by electron crystallography / H. Hebert, C. Jegerschold // Current Opinion in Structural Biology. – 2007. – Vol. 17. – P. 396–404.
2. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase / D. M. Molina [et al.] // Letters. – 2007. – Vol. 448, № 2. – P. 613–616.

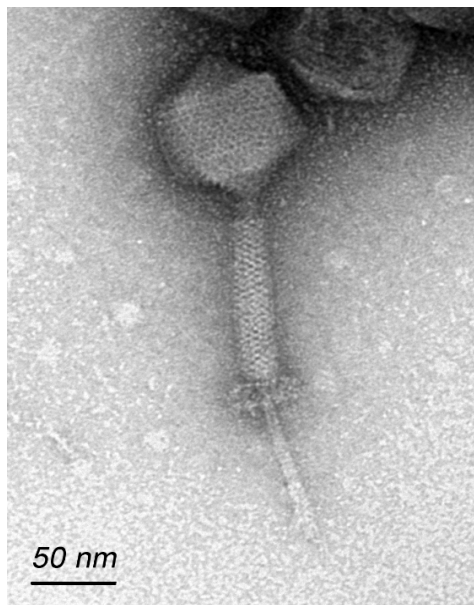
Бактериолитические свойства бактериофага iF6 и его эндолизинов

Бузиков Р.М.¹, Казанцева О.А.¹, Пилигримова Э.Г.¹, Рябова Н.А.^{1,2},
Шадрин А.М.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия, электронный адрес: andrey2010s@gmail.com

²Институт белка РАН, Пущино, Россия

С каждым годом растёт число инфекционных заболеваний, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами бактерий. По данным на 2019 г., не менее миллиона человек ежегодно умирают от антибиотикорезистентных инфекций [1]. Патогенные виды бактерий *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* являются одними из приоритетных кандидатов-мишеней для разработки новых терапевтических антибактериальных средств [1]. Одними из наиболее перспективных антибактериальных средств являются бактериофаги. По данным ВОЗ, в настоящее время проходят клинические испытания два лечебных коктейля на основе фагов и два лекарственных препарата на основе эндолизинов фагов [2]. В этой работе мы описываем вирулентный бактериофаг iF6 и свойства двух его эндолизинов (Gr82 и Gr84).



Микрофотография вириона бактериофага iF6, полученная с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

Бактериофаг iF6 был выделен из препарата «секстафаг» НПО микроген (см. рисунок). Секвенирование проведено на платформе Illumina. Хромосома фага iF6 имеет длину 156 592 п. н. и содержит два прямых концевых повтора по 2108 п. н. каждый. Филогенетический анализ показал принадлежность бактериофага iF6 к роду *Schiekvirus*, представителей которого характеризуют как фагов с высоким терапевтическим потенциалом [3–5]. Эндолизины iF6 были способны лизировать культуры энтерококков как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста. Особенно многообещающим является эндолизин Gr84. Он был активен в отношении 77 % протестированных штаммов энтерококков и оставался активным даже после 1 ч инкубации при 60 °С. Таким образом, iF6-подобные бактериофаги являются перспективной платформой для поиска и конструирования новых средств против антибиотикорезистентных энтерококков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Список использованных источников

1. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis / C.J. Murray [et al.] // *Lancet*. – 2022. – Vol. 399. – P. 629–655.
2. Geneva: World Health Organization 2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
3. *Enterococcus faecium* bacteriophage vB_EfaH_163, a new member of the *Herelleviridae* family, reduces the mortality associated with an *E. faecium* VanR clinical isolate in a *Galleria mellonella* animal model / I. Pradal [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – P. 179.
4. Jarvis, A.W. A study of five bacteriophages of the *Myoviridae* family which replicate on different gram-positive bacteria / A.W. Jarvis, L.J. Collins, H.W. Ackermann // *Arch. Virol.* – 1993. – Vol. 133. – P. 75–84.
5. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy / L. Khalifa [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – Vol. 81. – P. 2696–2705.

Микроорганизмы – продуценты полиаминов в структуре бактериального сообщества генитального тракта

Годовалов А.П.

*Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия,
электронный адрес: AGodovalov@gmail.com*

Среди бактериальных метаболитов особое место занимают полиамины – путресцин и кадаверин, участвующие в регуляции жизнедеятельности как отдельных клеток, так и всего микробного сообщества в целом [1], в состав которого входят микроорганизмы, продуцирующие полиамины. К ним относятся представители семейств *Enterobacteriaceae* и *Neisseriaceae*, поскольку обладают необходимыми для этого ферментами – орнитиндекарбоксилазой и лизиндекарбоксилазой. Представляет интерес изучение встречаемости таких микроорганизмов в генитальном тракте при бесплодии, так как полиамины бактериального происхождения могут участвовать в патогенезе бессимптомного, длительного воспалительного процесса [2].

Использовали образцы, полученные из заднего свода влагалища с помощью мерной ложки Фолькмана от 15 женщин, и пробы эякулята от 15 мужчин – их половых партнеров – при бесплодном браке. Метагеномное секвенирование 16S рРНК осуществляли на платформе Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit). Биоинформационный анализ полученных данных проводили с помощью сервера MG-RAST [3]. Концентрацию путресцина в спермальной жидкости определяли методом тонкослойной хроматографии [4].

В эякуляте энтеробактерии среди всех микроорганизмов составляли в среднем 8,7 % (SD 12,2 %) и представлены были родами *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и другими. При корреляционном анализе установлена прямая связь между их содержанием и концентрацией путресцина ($r = 0,55$) и кадаверина ($r = 0,62$) в спермальной жидкости. Представленность нейссерий в эякуляте была минимальной (0,03 %, SD 0,02 %) и не коррелировала с уровнем полиаминов. Известно, что эякулят богат такими полиаминами как спермин и спермидин [5], которые могут быть включены в метаболизм энтеробактерий, что является дополнительным источником путресцина. С другой стороны, увеличение синтеза кадаверина и путресцина энтеробактериями может быть отражением их ответной реакции на окислительный стресс [6]. Кроме этого, активные формы кислорода необходимы для регуляции функции сперматозоидов [7]. При этом достаточно часто таким процессам сопутствует бессим-

птомная бактериоспермия, обусловленная, как нами установлено ранее, более чем в трети случаев энтеробактериями [8].

В цервико-вагинальном содержимом энтеробактерий было существенно меньше, чем в эякуляте (0,6 %, SD 0,2 %), а их доля не коррелировала с уровнем путресцина и кадаверина. Доля основного комменсала вагинального биотопа – лактобактерий (41,9 %, SD 17,9 %) прямо коррелировала как с уровнем путресцина ($r = 0,36$), так и кадаверина ($r = 0,41$). Известно, что представители семейства *Lactobacillus* являются анаэробами, однако часть штаммов проявляют аэротолерантность, что может быть обусловлено продукцией полиаминов, которые выступают в роли сквенджеров свободных радикалов, ведь лактобактерии не обладают каталазой [9], способной нивелировать действие активных форм кислорода [10]. В связи с этим продукция лактобактериями полиаминов представляется их жизненно важной функцией. С другой стороны, оценка такой активности основного комменсала цервико-вагинального биотопа может быть использована как дополнительная характеристика штаммов, изолированных при проведении бактериологического исследования.

Таким образом, бактерии-продуценты кадаверина и путресцина имеют большие адаптационные возможности при колонизации генитального тракта человека.

Список использованных источников

1. Gevrekci, A.Ö. The roles of polyamines in microorganisms / A.Ö. Gevrekci // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 33, № 11. – P. 204.
2. García-Faroldi, G. The polyamine and histamine metabolic interplay in cancer and chronic inflammation / G. García-Faroldi, F. Sánchez-Jiménez, I. Fajardo // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2009. – Vol. 12, № 1. – P. 59–65.
3. Kent, W.J. BLAT – the BLAST-like alignment tool / W.J. Kent // Genome Res. – 2002. – Vol. 12, № 4. – P. 656–64.
4. Ткаченко, А.Г. Путресцин как модулятор содержания σ S-субъединицы РНК-полимеразы в клетках *Escherichia coli* при кислотном стрессе / А.Г. Ткаченко, М.С. Шумков, А.В. Ахова // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 2. – С. 237–46.
5. Ploskonos, M.V. Polyamines of urogenital tract men as factors of apoptosis regulation spermatozooids / M.V. Ploskonos, V.V. Evdokimov // Urologiia. – 2019. – № 4. – P. 74–79.
6. Wuddineh, W. Polyamines in the Context of Metabolic Networks / W. Wuddineh, R. Minocha, S.C. Minocha // Methods Mol. Biol. – 2018. – Vol. 1694. – P. 1–23.
7. Fujii, J. Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process / J. Fujii, S. Tsunoda // Asian J Androl. – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 420–3.
8. К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин / А.П. Годовалов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2022. – Т. 99, № 4. – С. 428–435.
9. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis / B.G. Spyropoulos [et al.] // Dig. Dis. Sci. – 2011. – Vol. 56. – P. 285–294.
10. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury / Y.S. Ho [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 32 804–32 812.

Характарыстыка мікраарганізмаў, выдзеленных із орнітогенных пачв Восточнай Антарктыды

Горелік К.М., Мямін В.Е.

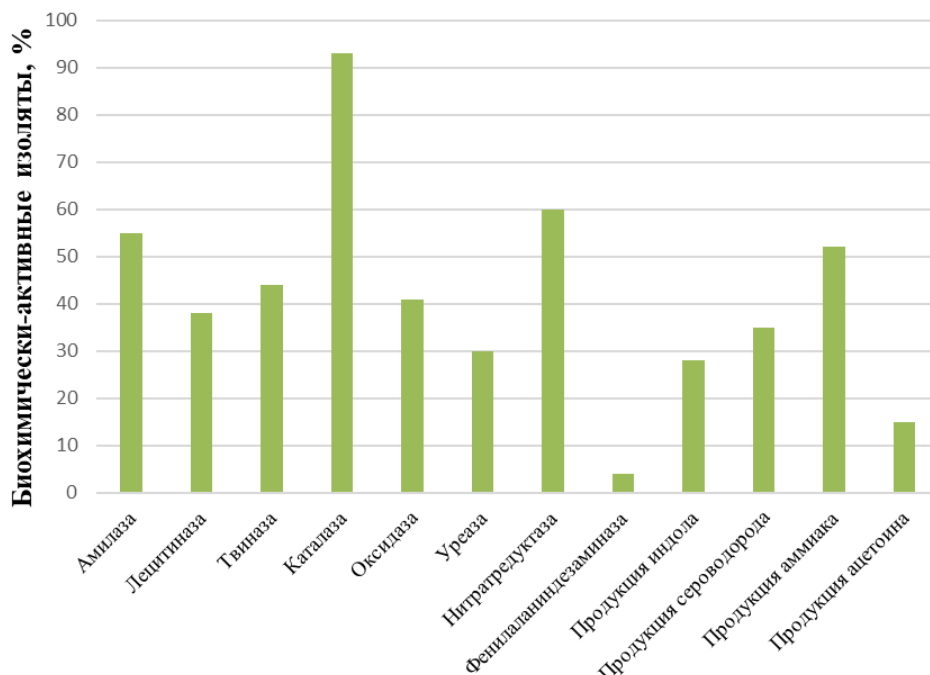
*Біялагічны факультэт, Беларускае дзяржаўнае ўніверсітэце,
Мінск, Беларусь, электронны адрэс: kirill.soloveov@yandex.by*

Орнітогенныя пачвы, змяшчаючыя ў сваёй кампаніі гуано пінгвінаў, распаўсюджаны ўсюды на тэрыторыі Антарктыды [1]. Арганічныя астаткі і адходы жыццядзейнасці птушак спрыяюць актыўнаму развіццю разнаобразнай мікробіаты [4]. Абар'ектам гэтага даследавання сталі абразцы орнітогенных пачв, абраныя ў Восточнай Антарктыцы (Земля Эндэрбі, палевае база Гора Вечэрняя) ў раёне лакалізацыі колоніі пінгвінаў Адэлі (прыкладна 2200 гнёздышчыхся пар). У выніку выдзялення мікраарганізмаў з 3 абразцаў пачв была атрыманая калекцыя, уключаючая больш за 150 ізолятаў бактэрыяў і мікроміцэтаў з рознымі морфалагічнымі і культуральнымі ўласцівасцямі. Для далейшай характарыстыкі і ідэнтыфікацыі былі абраны 28 ізолятаў бактэрыяў і 2 ізоляты мікроміцэтаў, найбольш морфалагічна адрозніваючыся ад аднаго ад другога.

Сярод 28 ізолятаў бактэрыяў 62 % прадстаўлены палочкавымі формамі, 38 % ад агульнага ліку ізолятаў з'яўляліся коккамі. Па выніках афарбавання па метадзе Грама 35 % з усіх ізолятаў аказаліся грамадаўстойлівымі, 65 % – грампалажымі.

Даследаванне ўплыву тэмпературы на рост выдзеленых ізолятаў дазволіла ўсталяваць, што аптымальнай (а для некаторых мікраарганізмаў і максімальнай) тэмпературай для большасці культур з'яўлялася 18 °С. Таксама для часткі ізолятаў аптымальнай аказалася тэмпература 28 і 37 °С.

Гаворачы аб фізіялагічна-біяхімічным патэнцыяле [2] выдзеленых культур, варта адзначыць, што ў 55 % ізолятаў была зафіксавана амілолітычная актыўнасць, у 38 % – лецыціназная актыўнасць з яечным жолткам, а таксама ў 44 % – твіназная актыўнасць. Каталазная актыўнасць была зафіксавана ў 93 % культур, аксідазная актыўнасць назіралася ў 41 % ізолятаў. Урэза адзначана ў 30 % ізолятаў, нітратрэдуктазу прадуюцыравалі 60 % культур, а фенілаланіндэзаміназа абнаружана толькі ў 1 ізолята. Разлаганне трыптофана да індала было характэрна для 28 % мікраарганізмаў. Сероводарод адносна амміака выдзяляла меншае колькасць культур – 35 і 52 % адпаведна. Ацэцін, атрыманым у выніку расщеплення глюкозы, абнаружваўся ў невялікай колькасці ізолятаў, што складала 15 % ад агульнага колькасці культур (см. рысунак).



Биохимическая активность

Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов орнитогенных почв

Отдельным этапом исследования являлось обнаружение антагонистической активности у выделенных изолятов микроорганизмов [3]. С помощью метода отсроченного антагонизма была зафиксирована продукция антибактериальных соединений у 5 изолятов из 28, что визуально наблюдалось как зоны ингибирования роста тест-культур бактерий. Метод перпендикулярных штрихов выявил антифунгальную активность по отношению к тест-культурам грибов у 4 изолятов.

Список использованных источников

1. Содержание и состав органического вещества литоземов острова Кинг-Джорж, Западная Антарктика / А.Е. Васильевич [и др.] // *Biol. Commun.* – 2009. – № 2. – С. 124–137.
2. Желдакова, Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы : учеб.-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. G-31 01 01 «Биология» / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин. – Минск : БГУ, 2006. – 116 с.
3. Лысак, В.В. Микробиология. Практикум : пособие / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.
4. Direct and Indirect Effects of Penguin Feces on Microbiomes in Antarctic Ornithogenic Soils / Y. Guo [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – Т. 9.

Молекулярно-биологическая идентификация дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктики

Грибанова Е.А.¹, Охремчук Е.В.², Семенчукова Е.А.², Гигиняк Ю.Г.,³
Мямин В.Е.^{1,3}

¹Биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, Беларусь, электронный адрес: lika-den98@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», Минск, Беларусь

Среди эукариотических организмов, обитающих в Антарктиде, особое внимание уделяется грибам и грибоподобным организмам. Основным таксоном грибов, обнаруживаемых в антарктических местообитаниях, является *Ascomycota* и его анаморфы, менее распространены *Basidiomycota*, *Mortierellomycota* и *Chytridiomycota* [3].

В качестве объектов исследования использовали 8 образцов мелкозема (для поиска гиполитов и эндолитов) из Восточной Антарктиды (Земля Эндерби, станция Молодежная и полевая база Гора Вечерняя; Земля Мак-Робертсона, горы Принс-Чарльз). В ходе проведенных исследований удалось выделить 21 изолят дрожжей с различной морфологией клеток и пигментацией колоний.

Первичная идентификация изолятов проводилась с использованием масс-спектрометрической системы Bruker MALDI BioTyper, которая позволяет анализировать белки микроорганизмов и сверять полученные спектры с имеющимися в базе данных спектрами известных бактерий и грибов. Ранее было показано, что такой подход приемлем для идентификации экстремофильных дрожжей [1]. С помощью данного метода нам удалось идентифицировать 7 изолятов дрожжей до рода, из которых 6 были отнесены к *Sporobolomyces* и 1 – к *Pseudozyma*. Два изолята были идентифицированы до вида, они представлены *Pseudozyma aphidis* и *Cryptococcus liquefaciens*. Однако большая часть изолятов идентифицирована не была, возможно, из-за отсутствия информации в базе данных прибора Bruker MALDI BioTyper.

В связи с этим дальнейшую идентификацию дрожжевых культур проводили путем секвенирования фрагментов 18S рДНК в составе плазмиды рJET1.2 с последующим сравнением последовательности вставки с нуклеотидными последовательностями, депонированными в базу данных GenBank. Амплификацию фрагментов 18S рДНК осуществляли с использованием праймеров NS1-NS4 [2].

В результате были идентифицированы все изучаемые изоляты дрожжей, процент идентичности с типовыми штаммами составил >98 % (см. таблицу). Согласно информации базы данных Index Fungorum, идентифицированные

изоляты дрожжей относятся к базидиомицетам, за исключением двух изолятов, которые по систематическому положению относятся к аскомицетам (*Mycochaetophora gentianae* и *Dothiora cannabinae*).

Результаты идентификации дрожжевых культур

Число изолятов	Таксономическая принадлежность	Код доступа в NCBI
2	<i>Moesziomyces parantarcticus</i>	NG_063534.1
3	<i>Leucosporidium fragarium</i>	NG_062180.1
1	<i>Naganishia antarctica</i>	NG_063457.1
1	<i>Mycochaetophora gentianae</i>	NG_064831.1
3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	NG_062726.1
6	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	NG_065040.1
2	<i>Cystobasidium pallidum</i>	NG_063519.1
1	<i>Solicoccozyma terricola</i>	NG_062962.1
1	<i>Glaciozyma litoralis</i>	NG_148930.1
1	<i>Dothiora cannabinae</i>	NG_062696.1

Согласно информации баз данных грибов и грибоподобных организмов, представленные в таблице таксоны встречаются в образцах почв (гиполитов и эндолитов) и воды Антарктиды, почве Альпийских лесов, морских ледников на Тибетском нагорье и других регионов с холодным климатом [4, 5].

Список использованных источников

1. Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Rapid Identification of Yeast Species From Polar Regions / C. He [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 13.
2. Molecular genetic identification of yeast from the fund of the belarusian collection of non-pathogenic microorganism / A.V. Savchik [et al.] // *Food Industry: Science and Technology.* – 2020. – Vol. 13, № 3 (49). – P. 61–69.
3. Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of Antarctica / G.C.A. de Menezes [et al.] // *Microorganisms.* – 2019. – Vol. 7, № 10. – C. 445.
4. Extracellular enzymes and bioactive compounds from Antarctic terrestrial fungi for bioprospecting / L. Zucconi [et al.] // *Internat. J. of Environmental Research and Public Health.* – 2020. – Vol. 17, № 18. – P. 6459.
5. Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils / L. França [et al.] // *Extremophiles.* – 2016. – Vol. 20. – P. 855–873.

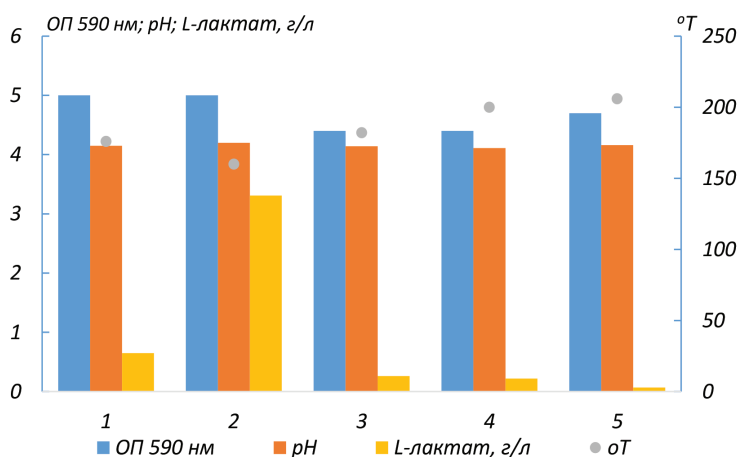
Продукцыя L-молочнай кіслоты бактэрыямі відаў *Lactiplantibacillus plantarum* і *Lactiplantibacillus paraplantarum*

Денісенка В.В., Найденко І.А., Сафонова М.Е.

Інстытут мікробіялогіі НАН Беларусі, Мінск, Беларусь,
 электронны адрас: biochem_lab@mbio.bas-net.by

Лактат з'яўляецца асноўным прадуктам метаболізму малочнакіслых бактэрыяў. Мікраарганізмы, прыналежаць да розных таксономічных груп, прадуюць малочную кіслоту ў выглядзе левавяртаючай L-, прававяртаючай D-формы, іх сумесі ў розных суадносінах. Малочнакіслыя бактэрыі відаў *Lactiplantibacillus plantarum* і *Lactiplantibacillus paraplantarum* – прадставіцелі адной з найбольш значымых па распаўсюджанасці ў прыродзе і магласці практычнага прымянення групы лактобацилл [1, 2]. У сувязі з гэтым вывучэнне прадуюць L-лактата гэтымі мікраарганізмамі прадставіць не толькі тэарэтычны, але і практычны інтарэс.

На рысунку прыведзены паказателі назаплення біямасы (ОП 590 нм) і кіслых прадуктаў метаболізму бактэрыямі відаў *L. plantarum* (чатыры штамы) і *L. paraplantarum* (адзін штамм) пасля 48 ч культивіравання пры 28 °С ў сродзе MRS [3].



Назаплення біямасы (ОП 590 нм) і кіслатоабразаючая здольнасць (pH; титруемая кіслотнасць, °С; L-лактат, г/л) малочнакіслых бактэрыяў *L. plantarum* 1 (1), *L. plantarum* 2 (2), *L. plantarum* 3 (3), *L. plantarum* 4 (4), *L. paraplantarum* 1 (5)

Усе даследуемыя лактобациллы характэрызаваліся актывным ростам і ацыдогенезам ў сродзе MRS. Паказателі аптычнай шчыльнасці культуральных

жидкостей бактерий варьировали от 4,4 (у штаммов *L. plantarum* 3 и *L. plantarum* 4) до 5,0 (у штаммов *L. plantarum* 1 и *L. plantarum* 2). Накопление кислых продуктов метаболизма в среде культивирования приводило к снижению рН до 4,11–4,20 и повышению уровня титруемой кислотности до 160–206 °Т.

Самые существенные различия (более чем в 47 раз) изучаемых культур были выявлены по уровню продукции L-лактата. Содержание левовращающего энантиомера молочной кислоты самым низким (0,07 г/л) оказалось в культуральной жидкости *L. paraplantarum* 1 и самым высоким (3,31 г/л) – у *L. plantarum* 2, хотя по показателю титруемой кислотности лактобациллы *L. paraplantarum* 1 были самыми активными. Среди микроорганизмов, принадлежащих к одному виду *L. plantarum*, уровень накопления L-лактата также существенно различался (в 15 раз). Показатели активной (рН 4,2) и титруемой (160°Т) кислотности бактерий *L. plantarum* 2 были наименьшими среди всех изучаемых лактобацилл.

Проведенные исследования позволяют сделать заключение о существенных штаммовых различиях молочнокислых бактерий *L. plantarum* по уровню продукции L-молочной кислоты, что необходимо учитывать при подборе культур в состав препаратов разного назначения.

Список использованных источников

1. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – 390 с.
2. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects / ed.: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand. – New York: Marcel Dekker Inc., 2004. – 629 p.
3. Man, J.C. A medium for the cultivation of Lactobacilli / J.C. Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23, № 1. – P. 130–135.

Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов – система электронного учета штаммов в коллекциях патогенных микроорганизмов

Дятлов И.А.¹, Шемякин И.Г.¹, Богун А.Г.¹, Благодатских С.А.¹, Козлов А.И.¹, Сизова А.А.¹, Соломенцев В.И.¹, Стариков П.П.², Абрамов А.А.², Воробьев А.Н.², Дубицкий К.А.², Козлов Н.А.², Кошелева У.В.², Мезин М.Г.², Петрухин Д.Д.², Съедин Д.Ю.²

¹ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Серпухов, п. Оболенск, Россия,
электронный адрес: bogun62@mail.ru

²ФГАНУ ЦИТиС Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки,
Москва, Россия

Составление и ведение каталога коллекционных штаммов является кропотливой научной задачей, требующей внимания и аккуратности. Чрезвычайно важно правильно определять фенотипические и генетические признаки депонированных микроорганизмов и документировать их в паспортах штаммов. Увеличение объема коллекционного фонда приводит к необходимости организации учёта данных о депонированных штаммах в электронном виде. В таком случае становится возможным быстро найти среди коллекционных штаммов микроорганизмы имеющие необходимые свойства и использовать их в научной или практической работе.

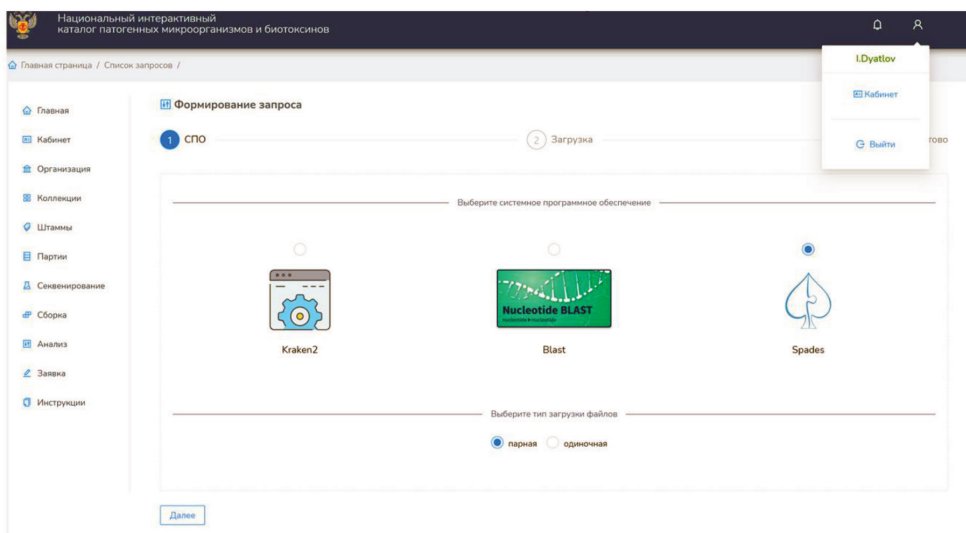
В большинстве случаев для учёта информации о штаммах в коллекциях используются широко распространённое программное обеспечение – Microsoft Word, Excel, система управления базами данных Access. Ведущие мировые коллекции разрабатывают специализированные системы учёта штаммов в своём коллекционном фонде. При этом подобное программное обеспечение нацелено на обработку информации только о фонде конкретной коллекции, а информация о близких штаммах из других коллекций не обрабатывается такими системами. Одним из исключений является электронный ресурс *VacDive*, в котором приводится информация о штаммах из разных коллекций.

В последние несколько лет технологии геномного анализа стали широко использоваться для изучения штаммов патогенных микроорганизмов. Обладая высокой универсальностью и воспроизводимостью геномный анализ позволяет получить информацию о структуре всего генома изучаемого микроорганизма. В случае если изученные гены известны, аннотированы, а информация об их функциях размещена в базах данных геномные исследования позволяют с высокой степенью достоверности прогнозировать фенотипические свойства изучаемых микроорганизмов. В подобных случаях появляется возможность отбирать из коллекционных фондов штаммы микроорганизмов, основываясь

на их геномных последовательностях. При этом в настоящее время не существует сервисов, адаптированных для поиска штаммов в микробных коллекциях, основывающихся на их геномных последовательностях. Существующие банки геномных последовательностей не осуществляют поиск среди штаммов микроорганизмов, депонированных в коллекционные фонды, а нацелены на анализ нуклеотидных последовательностей.

Нами разработана специализированная онлайн-система для учёта штаммов патогенных микроорганизмов в коллекционных фондах, получившая название Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов (НИК ПМБ). Все электронно-вычислительные компоненты системы разработаны и размещены на территории Российской Федерации.

НИК ПМБ содержит вычислительные компоненты для работы с геномными данными. Система взаимодействует с пользователем через личные кабинеты. В системе реализован модуль анализа метагеномных данных Kraken 2, алгоритм поиска нуклеотидных последовательностей Blast, а также программа для реконструкции геномных последовательностей из данных массивированного параллельного секвенирования Spades (см. рисунок).



Интерфейс национального интерактивного каталога

В системе реализованы возможности работы нескольких пользователей с разными ролями. Пользователь «**Центр мониторинга**» способен просматривать разделы статистика, просмотр сводных аналитических форм, для всех коллекций, включенных в НИК ПМБ, но не может осуществлять редактирование в системе.

Руководитель коллекции принимает решения о выдаче запрашиваемого штамма, имеет полномочия подписывать электронной подписью документы, просматривать сводные аналитические формы, а также создавать личные кабинеты пользователей, осуществляющих деятельность в данной коллекции.

Ответственный исполнитель имеет полномочия на ввод данных о депонированных микроорганизмах, ввод данных о проведенных исследованиях, а также способен подписывать протоколы исследований электронной подписью.

Непосредственный исполнитель способен осуществлять ввод данных о признаках исследованных микроорганизмов, а также их паспортных характеристиках. Вводимые системой данные должны проверяться ответственным исполнителем.

В системе НИК ПМБ может быть интегрирована информация о фонде микроорганизмов, находящихся в разных коллекциях. При этом может быть создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей, которая позволяет осуществлять выбор штаммов с необходимыми генетическими фондами в разных коллекциях, подключенных к системе.

В дальнейшем возможна интеграция НИК ПМБ с разрабатываемой в Российской Федерации Национальной база генетической информации (НБГИ).

Список использованных источников

1. Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов / И.А. Дятлов, И.Г. Шемякин, С.А. Благодатских, А.Г. Богун, А.И. Козлов, А.А. Сизова, В.И. Соколенцев, П.П. Стариков, А.А. Абрамов, А.Н. Воробьев, К.А. Дубицкий, Н.А. Козлов, У.В. Кошелева, М.Г. Мезин, Д.Д. Петрухин, Д.Ю. Съедин. Свидетельство о регистрации базы данных 2021622718, 30.11.2021. Заявка № 2021622473 от 12.11.2021.

2. Электронный каталог «ГКПМ-Оболensk» / А.А. Сизова, А.Г. Богун, А.А. Кисличкина, Ю.П. Скрябин. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2018621687, 29.10.2018. Заявка № 2018621338 от 28.09.2018.

3. Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов – современная информационная система для учета коллекционных штаммов и анализа их геномов / А.Г. Богун [и др.] // Бактериология. – 2023. – Т. 6, № 3. – С. 22.

Изменение метаболической активности алкалофильного *Bacillus aequororis* 5-ДБ при различных рН и концентрации хлорида натрия

Елисеева А.Д.¹, Максимова Ю.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия, электронный адрес: liamrik@list.ru

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
Пермь, Россия

Бактерии рода *Bacillus* широко применяются в ветеринарии, медицине и биотехнологии [1]. Большой интерес представляют виды, устойчивые к неблагоприятным условиям среды, так как они обладают большим биотехнологическим потенциалом. Как правило, ферменты данных микроорганизмов высокоактивны и стабильны в неблагоприятных условиях, в том числе при защелачивании и в присутствии высоких концентраций солей. В связи с этим актуален поиск новых эффективных штаммов с полезными свойствами в экстремальных биотопах.

Целью настоящей работы являлось изучение метаболической активности алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ в сравнении со слабоалкалотолерантным *B. subtilis* ATCC 6633 в условиях повышенной минерализации и широком диапазоне рН среды.

B. aequororis 5-ДБ был выделен с поверхности грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод». Ранее показано присутствие липазной и амилазной активности у этого штамма [2]. Изучали влияние различного состава среды (рН 3–13, 0,5 и 50 г/л NaCl) на дегидрогеназную активность двух штаммов бацилл, используя витальный краситель PrestoBlue® согласно протоколу изготовителя (Invitrogen, США).

Исследование показало, что при рН 3 и 13 во всех вариантах физиологическая активность клеток обеих культур являлась крайне низкой или отсутствовала. Культура *B. aequororis* 5-ДБ проявляла высокую физиологическую активность примерно на одинаковом уровне в широком диапазоне рН (от 5 до 11). Максимальная активность культуры *B. aequororis* 5-ДБ проявлялась в условиях 2-часовой инкубации при концентрации соли 0,5 г/л. В то время как штамм *B. subtilis* ATCC 6633 максимальную активность проявлял при рН питательной среды 5 и 9 при концентрации соли 0,5 г/л. Дальнейшая инкубация в течение 24 и 48 ч приводила к постепенному снижению метаболической активности обеих культур. Однако метаболическая активность *B. aequororis* 5-ДБ оставалась в среднем в 6 раз выше в сравнении со штаммом *B. subtilis* ATCC 6633.

Таким образом, показано, что штамм алкалофильных бацилл с гидролитической активностью более устойчив в условиях неблагоприятных рН и высоких концентраций солей, что делает его перспективным для дальнейшего биотехнологического применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Список использованных источников

1. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications / P. Kumar [et al.] // *Biotechnology advances*. – 2013. – Vol. 31, № 8. – P. 1543–1561.

2. Шилова, А.В. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // *Микробиология*. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155–165.

Описание нового вида – сульфатредуцирующей бактерии, выделенной из донных отложений Японского моря

Еськова А.И., Пономарева А.Л.

Тихоокеанский океанологический институт имени В.И. Ильичева,
ДВО РАН, Владивосток, Россия, электронный адрес: eskova.ai@poi.dvo.ru

В ходе выполнения комплексной геолого-геофизической экспедиции ТОИ ДВО РАН на НИС «Академик Опарин» (рейс № 54, сентябрь – октябрь 2017 г., руководитель рейса к. г-м. н. М.Г. Валитов) [1] из донных отложений северной части Японского моря с глубины 592 метра нами выделен изолят сульфатредуцирующей бактерии, который был обозначен как SRJS8. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что выделенный штамм является представителем рода *Desulfosporosinus*. Изолят был представлен грамотрицательными подвижными одиночными спорообразующими палочками размером $0,5 \times 3,5$ мкм (рис. 1). Клетки одиночные. Изолят является мезофилом, растет в диапазоне температур от 20 до 30 °С (оптимум 25 °С) при pH 6–8 (оптимум 7,17–7,26). Зафиксирован рост в диапазоне NaCl от 0 до 10 г/л (оптимум 2 г/л).

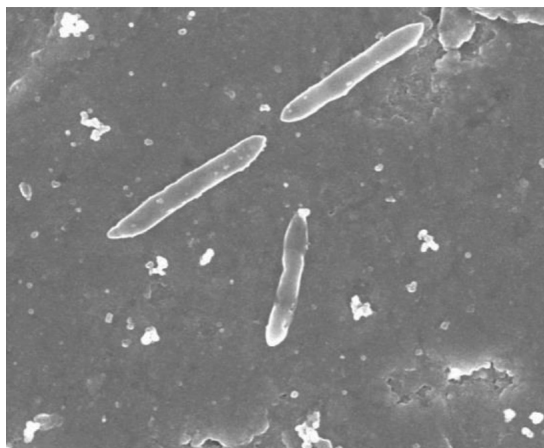


Рис. 1. Морфология *Desulfosporosinus* sp. SRJS8

Полученная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *Desulfosporosinus* sp. SRJS8 была депонирована в GenBank под номером MT740695.2, а также во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКР) ИБФМ им. Г.К. Скребины РАН под номером В-3540.

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК ближайшим соседом с 98,5 % сходства является *D. lacus STP 12^T* (AJ582757) – бактерия, выделенная из донных отложений озера Штехлин, Германия. Этот штамм был выписан в качестве референс-штамма из Коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ (Брауншвейг, Германия).

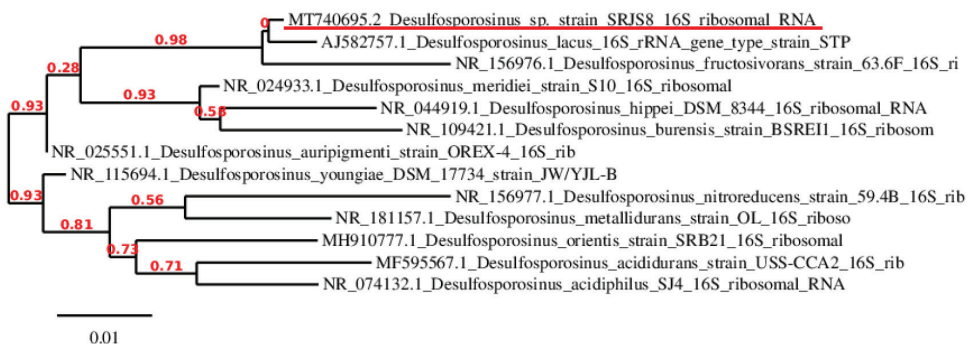


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма SRJS8 среди ближайших гомологов

В ходе исследований было определено, что полученный нами штамм *Desulfosporosinus* sp. SRJS8 в присутствии сульфата способен использовать ацетат (20 мМ), формиат (10 мМ), фумарат (10 мМ), этанол (10 мМ), метанол (10 мМ), лактат (20 мМ), дрожжевой экстракт (1 г/л) в качестве источника углерода и донора электронов. *Desulfosporosinus* sp. SRJS8 не использовал аланин, глицерин, сукцинат, малат, бензоат, цитрат и глюкозу. Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм *Desulfosporosinus* sp. SRJS8 применял тиосульфат, но не использовал элементную серу и сульфит. Референс-штамм не проявлял рост на пептоне и ацетате.

Изучение профилей жирных кислот выделенного штамма *Desulfosporosinus* sp. SRJS8 показало, что доминирующими жирными кислотами являются пальмитоолеиновая (C16:1), гексадекановая (C16:0), iC15:0 миристиновая (C14:0), а минорными компонентами – C15:0, iC17:0, C17:1, aC17:0, C18:1, C18:0. У референс-штамма преобладающими жирными кислотами в клетках являются: пальмитоолеиновая (C16:1), гексадекановая (C16:0), C18:1cis11.

Секвенирование генома штамма проводили с использованием платформы Illumina NovaSeq. Содержание Г+Ц в ДНК исследуемого штамма SRJS8 составило $42,08 \pm 0,3$ %. При парных сравнениях Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) значения d0, d4 и d6 ДНК-ДНК (dDDH) гибридизации не превышали 57,4 %. Геномный анализ также выявил отличия в значении ANI (86,7 %) между штаммом SRJS8 и ближайшим типовым штаммом *Desulfosporosinus lacus*.

Поскольку значения dDDH ниже 70 % (пороговое значение для определения нового вида), а ANI < 95 % [2], следовательно, изолят SRJS8 представляет новый вид рода *Desulfosporosinus*, для которого предложено название *Desulfosporosinus shakirovii* sp. nov. Последовательность генома штамма SRJS8 доступна в NCBI GenBank под номером JAJDOO010 000 000.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания: «Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, биогеохимических, геологических процессов и ресурсов Дальнего Востока» (0211-2021-0012). Регистрационный номер: АААА-А19-119 122 090 009-2

Список использованных источников

1. Комплексная геолого-геофизическая экспедиция на научно-исследовательском судне «Академик Опарин» в Татарском Проливе Японского моря (Рейс № 54, 2017 г.) / М.Г. Валитов [и др.] // Океанология. – 2019. – Т. 59, № 2. – С. 311–314.
2. Meier-Kolthoff, J.P. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions / J.P. Meier-Kolthoff, A.F. Auch, H.P. Klenk // BMC Bioinformatics. – 2013. – Vol. 14, № 6. doi: org/10.1186/1471-2105-14-60

Разработка тест-системы для поиска новых регуляторных РНК

Иванова Е.В.^{1,2}, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, Россия, электронный адрес: ivanova05evgenia99@yandex.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия

Малые некодирующие РНК участвуют в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, что приводит к изменению количества целевого белка. Существует довольно много биоинформатических инструментов, позволяющих предсказать наличие гена нкРНК в геноме, однако верификация данных биоинформатического анализа затруднена ввиду трудоемкости процесса. Стандартная процедура подтверждения существования регуляторной РНК включает в себя создание штаммов, дефектных по синтезу нкРНК, поскольку каждая регуляторная РНК рассматривается исследователями как участник конкретного метаболического процесса. Мы решили разработать тест-систему, которую можно использовать для создания библиотек регуляторных РНК и/или мРНК мишеней, что сократит процесс верификации.

Тест-система для поиска новых регуляторных РНК должна была отвечать следующим требованиям: 1) состоять из 2 плазмид, для реализации возможности тестировать одну потенциальную нкРНК относительно разных мРНК мишеней или тестировать одну мРНК мишень относительно разных потенциальных нкРНК; первая плазида должна представлять собой трансляционный fusion, где репортерный ген слит с 5'нетранслируемой областью мРНК мишени и конститутивным промотором; вторая плазида должна представлять собой транскрипционный fusion, в котором экспрессия тестируемой нкРНК будет находиться под контролем конститутивного промотора, 2) позволять создавать избыток нкРНК относительно мишени мРНК.

На первом этапе необходимо было выбрать промоторы, которые позволили бы экспрессировать нкРНК и репортерный белок. В качестве матрицы для конструирования выбрали плазмиду рTurboGFP-B (Евроген, Россия). Плазида содержит ориджин репликации ColE1, ген устойчивости к ампициллину и ген *gfp*, кодирующий мутантный вариант зеленого флуоресцентного белка CopGFP из копеподы *Pontellina plumata*. Экспрессия целевого белка находится под контролем T5 промотора. Разработаны праймеры для конструирования беспромоторного варианта плазмиды рTurboGFP-B – рTurboGFP(B)PRL, что позволило в дальнейшем, при клонировании различных конститутивных промоторов, отбирать корректные конструкции, ориентируясь на накопление зеленого флуоресцентного белка.

На втором этапе в плазмидном векторе pTurboGFP(B)PRL был клонирован ряд конститутивных промоторов: сильный синтетический промотор *tac*, состоящий из -35 области промотора триптофанового оперона и -10 области промотора лактозного оперона, и 11 конститутивных промоторов разной силы из образцов метагеномов почв. В дальнейшем мы планируем выбрать пары промоторов, которые позволят нам создавать избыток нкРНК относительно мРНК мишени, и протестировать разработанную систему на объектах, взаимодействие между которыми экспериментально подтверждено: нкРНК *NrsZ* и мРНК гена рамнозилтрансферазы *rhlA*, нкРНК *PrrF* и мРНК регуляторного гена *antR*, который модулирует экспрессию оперона трансформации антранилата.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-01138, <https://rscf.ru/project/22-24-01138>.

Умеренные бактериофаги: недооценённый потенциал профагов в экологии и эволюции бактерий

Казанцева О.А., Шадрин А.М.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия,
электронный адрес: olesyakazantseva@bk.ru*

Бактериофаги (фаги) – вирусы, инфицирующие бактерии. В зависимости от жизненного цикла фаги подразделяют на вирулентные (облигатно литические) и умеренные. Вирулентные фаги имеют строго литический путь развития, в ходе которого после заражения клетки и сборки нового поколения вирусных частиц фаги лизируют бактериальную клеточную стенку, убивая своих хозяев. Умеренные фаги, помимо литического, имеют лизогенный путь развития, который характеризуется длительным пребыванием фага в состоянии профага в клетке бактериального хозяина. Появление индуцирующего фактора (УФ, митомицин С и др.) может привести к переключению лизогенного пути развития на литический. Существует две основные формы профагов: интегрированные (ДНК профага встраивается в хромосому или плазмиду хозяина) и плазмидные профаги (ДНК профага находится в виде автономно-реплицирующийся линейной или циркулярной плазмиды). Биологически активные профаги индуцибельны и способны продуцировать функциональные фаговые частицы, однако они могут мутировать в неактивные формы, неспособные к воспроизведению.

Фаги широко распространены во всех местообитаниях своих прокариотических хозяев и оказывают значительное влияние на динамику и эволюцию популяций бактерий. Хорошо известно, что вирулентные фаги могут осуществлять значимую регулировку плотности популяции бактерий в различных экосистемах, а также могут управлять бактериальным разнообразием популяции и направлять бактериальную эволюцию в сторону устойчивости к фагам посредством приобретения бактериями систем защиты от фагов и изменения клеточных рецепторов. Напротив, умеренные профаги, как правило, оказывают более скромное влияние на динамику бактериальной популяции, однако могут управлять бактериальной эволюцией, способствуя латеральному переносу вспомогательных генов, которые экспрессируются в состоянии профага (при этом вклад в эволюцию могут осуществлять как активные, так и деградированные формы профагов).

На 2021 г. были определены последовательности более 14 000 полных геномов бактериофагов, из которых только 30 % приходилось на умеренные фаги, при этом 54 % из них было изолировано только от трех бактериальных ро-

дов [1]. Для подавляющего большинства бактериальных штаммов роль профагового носительства, особенно множественного профагового носительства, плохо изучена. Полилизогению часто считают результатом адаптивного эволюционного процесса, в котором профаги могут передавать бактерии-хозяину факторы приспособленности и/или вирулентности, что делает их важными векторами для эволюции бактериальных популяций. Для понимания реального вклада, вносимого умеренными фагами в экологию и эволюцию бактерий требуется более детальное изучение как можно большего количества умеренных фагов выделенных от большего разнообразия хозяев.

В данной работе мы описываем новые умеренные фаги B13 [2] и B473, проявляющих литическую активность в отношении бактерий рода *Bacillus*. Исследуемые фаги были индуцированы из бактериальных штаммов *B. cereus* VKM B-13 и *B. cereus* VKM B-473 с помощью митомицина С. Секвенирование ДНК B13 и B473 проводили на платформе Illumina, с последующей сборкой геномов с помощью SPAdes. Геномы B13 и B473 представляют собой линейные дцДНК с длиной и GC-составом: 36 864 п. н., 34,8 % и 41 205 п. н., 34,9 % соответственно. Геномы B13 и B473 содержат 53 и 60 открытых рамок считывания, из которых функционально аннотированы с использованием BLASTp (NCBI) и HHPred были 30 (56,6 %) и 34 (56,7 %) соответственно. Расположение и набор хвостовых генов как у B13, так и у B473 указывает, что фаги обладают морфотипом siphovirus. Филогенетически B13 и B473 значительно удалены от ближайших родственных вирусов. BLASTn анализ показал, что нуклеотидная идентичность B13 с геномом наиболее родственного бактериофага, *Bacillus* phage BMBtp1 составляет менее 28 %, также как и в случае B473 и его ближайшего родственника *Bacillus* phage B13. Таким образом, согласно критериям международного комитета по таксономии вирусов [3] бактериофаги B13 и B473 являются представителями и основателями новых высокоранговых вирусных таксонов: рода *Bunatrivirus* вид *Bunatrivirus* B13 и рода *Bquatseptivirus* вид *Bquatseptivirus* B473.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-15-00385.

Список использованных источников

1. Infrastructure for a phage reference database: identification of large-scale biases in the current collection of cultured phage genomes / R. Cook [et al.] // *Phage*. – 2021. – Vol. 2, № 4. – P. 214–223.
2. Kazantseva, O.A. Novel *Bacillus*-Infecting Bacteriophage B13 – The Founding Member of the Proposed New Genus *Bunatrivirus* / O.A. Kazantseva, E.G. Pilgrimova, A.M. Shadrin // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2300.
3. Turner, D. A roadmap for genome-based phage taxonomy / D. Turner, A.M. Kropinski, E.M. Adriaenssens // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 3. – P. 506.

Влияние нокаута гена внутриклеточной β -глюкозидазы на индукцию транскрипции гена целлобиогидролазы 1 *Penicillium verruculosum*

Кислицин В.Ю.¹, Чулкин А.М.¹, Рожкова А.М.^{1,2}

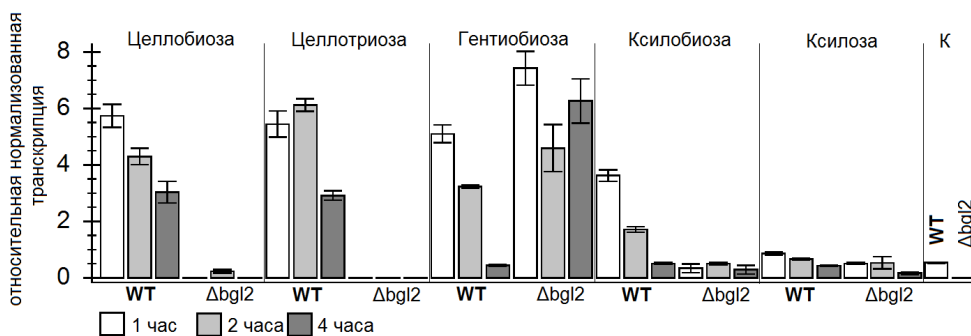
¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия,
электронный адрес: kislitsin.val@gmail.com

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

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* является промышленным продуцентом препаратов целлюлаз. Его продуктивность достигает до 50 г секретируемого белка на литр культуральной жидкости (КЖ) при культивировании на ферментационной среде, содержащей микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ). Основными компонентами секретируемого им комплекса являются целлобиогидролаза 1 (ЦБГ1) (30–35 %), ЦБГ2 (15–20 %), эндоглюканазы (10–12 %) и β -глюкозидаза (3–5 %) [1].

Важной задачей биотехнологии является увеличение продуктивности продуцентов ферментных препаратов (ФП) и, как следствие, уменьшение издержек производства. Среди современных способов решения данной задачи весьма перспективными являются подходы, основанные на использовании метаболической инженерии. Например, в мицелиальном грибе *P. decumbens*, также используемом для производства целлюлаз, удалось повысить продуктивность за счет нокаута гена внутриклеточной β -глюкозидазы, активность которой приводила к накоплению глюкозы внутри клетки, активируя этим углеродную катабалитную репрессию [2].

Нами был обнаружен ген внутриклеточной β -глюкозидазы *P. verruculosum* и проведен его нокаут с помощью системы CRISPR-Cas9. Однако вместо ожидаемого увеличения продуктивности в штамме *P. verruculosum* Δ bg12 мы обнаружили практически полное отсутствие экспрессии целлюлаз на ферментационной среде с добавлением МКЦ. Чтобы определить причину наблюдаемого эффекта нами методом количественной ПЦР определена относительная нормализованная транскрипция гена ЦБГ1 (*cbh1*) на минимальной среде с добавлением индукторов. Ранее было показано, что транскрипцию гена *cbh1* индуцируют целлобиоза, целлотриоза, гентиобиоза, ксилоза и ксилобиоза [3]. При определении относительного уровня транскрипции гена *cbh1* у штамма *P. verruculosum* Δ bg12 обнаружено, что транскрипция этого гена больше не индуцируется целлобиозой и целлотриозой, но не изменяется под действием гентиобиозы и ксилозы (см. рисунок). Гентиобиоза – это редкий в природе дисахарид образующийся в основном за счёт побочной реакции трансгликозирования глюкозы β -глюкозидазами.



Относительная нормализованная транскрипция гена *cbh1* под действием индукторов:
WT – штамм *P. verruculosum* B1-221-151; K – пробы без добавления индукторов

Таким образом, наблюдаемое отсутствие экспрессии целлюлаз при но-кауте гена *bgl2* *P. verruculosum* объясняется тем, что основным индуктором целлюлаз у данного мицелиального гриба является гентиобиоза, а целлобиоза и целлотриоза, основные продукты гидролиза МКЦ, индуцируют транскрипцию целлюлаз после превращения в гентиобиозу под действием внутриклеточной β-глюкозидазы. В дальнейшем планируется получить рекомбинантный белок внутриклеточной β-глюкозидазы *P. verruculosum* и определить его каталитические характеристики.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021).

Список использованных источников

1. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) / А.П. Сеницын [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 6. – С. 551–560.
2. Promotion of extracellular lignocellulolytic enzymes production by restraining the intracellular b-glucosidase in *Penicillium decumbens* / M. Chen [et al.] // Bioresource Technology. – 2013. – Vol. 137. – P. 33–40.
3. Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* / В.Ю. Кислицин [и др.] // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, № 1. – С. 64–65.

Характеристика бактериофага *Enterococcus* B1578 и его эндолизина 1578 NALAA

Копосова О.Н.¹, Казанцева О.А.¹, Семкин Д.А.¹, Кулябин В.А.¹,
Скорынина А.В.¹, Рябова Н.А.^{1,2}, Шадрин А.М.¹

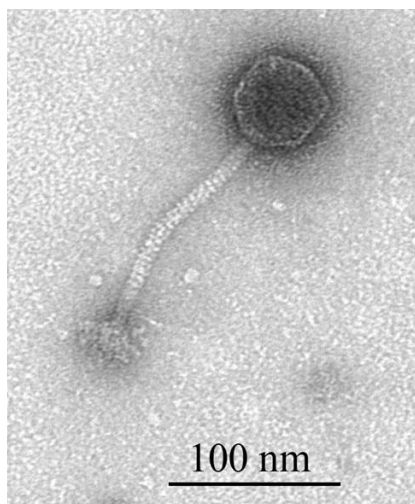
¹ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
Пушино, Россия, электронный адрес: olga.n.koposova@mail.ru

²Институт белка РАН, Московская область, Пушино, Россия

Бактерии рода *Enterococcus* широко распространены в окружающей среде. Существуют непатогенные, патогенные и условно-патогенные виды энтерококков. *E. faecalis* и *E. faecium* относятся к третьей группе и часто встречаются в естественном микробиоме человека и животных [1]. В последние десятилетия увеличивается частота внутрибольничных инфекций, вызванных этими энтерококками. Это инфекции мочевыводящих путей, эндокардиты, бактериемии и др. Особенное беспокойство вызывают энтерококки с устойчивостью к ванкомицину, пенициллину и аминогликозидам. При этом среди представителей *E. faecium* чаще встречаются антибиотикоустойчивые штаммы, чем среди *E. faecalis* [2].

Эндолизины – ферменты, разрушающие бактериальную клеточную стенку на финальной стадии литического цикла заражения бактерии бактериофагом. В настоящее время их активно исследуют как новую группу антибактериальных средств для применения в медицине и пищевой промышленности [3, 4]. Эндолизины относят к одному из перспективных способов борьбы с антибиотикорезистентными бактериями. По сравнению с бактериофагами, эндолизины обладают более широким спектром действия на бактериальные штаммы, но более узким по сравнению с привычными антибиотиками. Также показано, что у бактерий медленно формируется устойчивость к эндолизинам [5].

Из штамма *Enterococcus* sp. VKM B-1578 при помощи индукции митомицином С был выделен умеренный бактериофаг B1578. Были описаны его свойства и аннотирован геном. Это умеренный бактериофаг с узким спектром хозяев: из 24 штаммов энтерококков лабораторной коллекции он оказался способен заражать только один – *E. faecium* VKPM B-5000. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано, что B1578 относится к морфотипу *siphovirus*: имеет характерные икосаэдрический капсид и длинный несокращающийся хвост. Геном бактериофага B1578 представляет собой линейную дцДНК длиной 40 049 п. н. При аннотации генома был обнаружен ген, кодирующий N-ацетилмурамоил-L-аланин амидазу (1578-NALAA) – фермент одной из групп эндолизинов [6].



ТЭМ бактэрыофага B1578

Для изучения свойств 1578 NALAA его ген был клонирован в плазмиду pET33 (см. рисунок). Суперпродукция белка осуществлялась в *E. coli* BL21(DE3). Поскольку целевой белок продуцировался в виде телец включения, для очистки белка использовалась солубилизация в буфере с 8 М мочевиной; очистка методом аффинной хроматографии в денатурирующих условиях и рефолдинг при диализе. Для полученного препарата 1578 NALAA был определен спектр антибактериальной активности (спот-тест), pH и термостабильность, с помощью турбидиметрического метода.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Characterization of *Enterococcus faecalis* Phage IME-EF1 and Its Endolysin / W. Zhang [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, iss. 11.
2. Nelson, I. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment / I. Nelson, H. Agudelo, M. Huycke // *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* – Boston : Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
3. Phage Endolysin LysP108 Showed Promising Antibacterial Potential Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ Y. Lu [et al.] // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11.
4. Phages and Enzybiotics in Food Biopreservation / J. Ramos-Vivas [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, iss. 5138.
5. Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance / M.U. Rahman [et al.] // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10, iss. 1277.
6. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan / A. Vermassen [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10, iss. 331.

Высокопроизводительные методы для геномной таксономии промышленно значимых аскомицет

Корженков А.А.

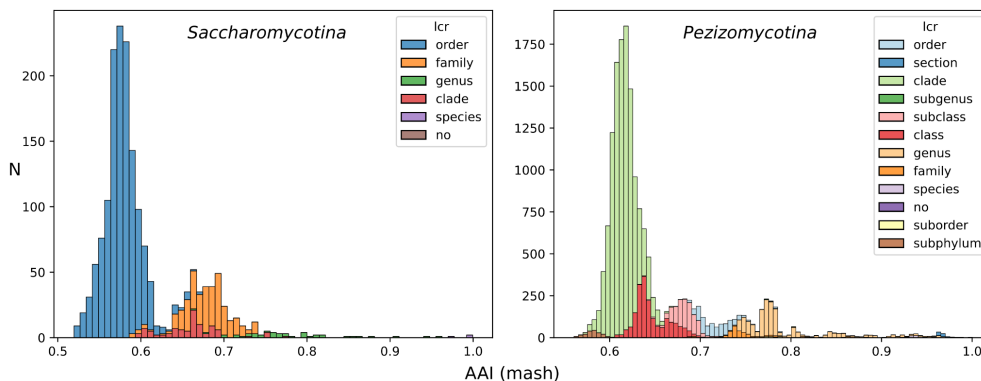
Курчатовский геномный центр, НИЦ «Курчатовский институт»,
Москва, Россия, электронный адрес: Korzhenkov_AA@nrcki.ru

Применение методов молекулярной биологии для таксономии грибов началось в 1970-х с использования данных о Г+Ц составе генома и ДНК-ДНК гибридизации, сменившись в конце 1980-х на сравнение последовательностей регионов D1/D2 рРНК, дополненное в 2000-х филогенетическим и филогеномным подходами [1]. Оценка средней идентичности геномов (ANI – англ. average nucleotide identity) широко применяется для разделения видов прокариотических организмов с пороговым значением в 95 % [2]. Применимость этого метода для геномов грибов была оценена на выборке из 1544 геномов: для более чем 90 % случаев удавалось корректно определить принадлежность к одному или разным видам на основании значения ANI [3]. Более детальное исследование было проведено для представителей рода *Metschnikowia* не подтвердило однозначно применимость этого метода [4], в то время как геномный анализ *Saccharomonospora* показал адекватность показателей ANI и AAI (англ. average amino acid identity – средняя аминокислотная идентичность) [5]. Целью работы стала оценка применимости методов полногеномного анализа для таксономической классификации аскомицет и определения возможных пороговых значений показателей геномной идентичности.

Pezizomycotina и *Saccharomycotina* – это наиболее крупные подотделы Аскомицет. Сахаромицеты включают такие важные промышленные микроорганизмы как представители родов *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Brettanomyces*, *Pichia*. К промышленно-значимым представителям *Pezizomycotina* относят *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Penicillium* и др. Исторически, анаморфы и телеоморфы (стадии бесполого и полового размножения) грибов описывались как самостоятельные виды, а таксономическая классификация проводилась в основном по морфологическим и физиологическим данным, что привело к ряду несоответствий в филогении и таксономии этой группы организмов.

Из базы NCBI были выгружены данные типовых штаммов: *Saccharomycotina* (417 геномов и 69 предсказанных протеомов) и *Pezizomycotina* (386 геномов и 185 предсказанных протеомов). Оценка ANI проводилась при помощи ruANI и mash, оценка AAI проводила при помощи aai.rb в режимах BLAST и diamond и mash. Дополнительно, для *Saccharomycotina* были предсказаны открытые рамки считывания программами GeneMark-EP и ORFm. Программа

mash использует алгоритм MinHash, что позволяет от выравнивания фрагментов генома или гена перейти к сравнению т. н. скетчей, имеющих значительно меньший размер. Использование программы mash сокращает время анализа на 3–4 порядка с десятков часов до нескольких секунд на персональном компьютере при сохранении высокой корреляции полученных результатов для AAI ($R = 0,967$) и ANI ($R = 0,975$) с результатами BLAST.



Распределение попарных значений AAI в двух подотделах аскомицет

Распределение значений AAI (см. рисунок) демонстрирует явную границу и позволяет выделить представителей одного порядка, семейства или рода на основании экспрессного полногеномного анализа.

Для представителей некоторых видов *Fusarium* выявлено низкое внутривидовое значение ANI (~90 %), что свидетельствует о возможной необходимости реклассификации, в то же время разные виды *Saccharomyces* и *Komagataella* имеют высокую идентичность (более 98 и 96 % соответственно).

Список использованных источников

1. Towards yeast taxogenomics: lessons from novel species descriptions based on complete genome sequences / D. Libkind [et al.] // FEMS Yeast Research. – 2020. – Vol. 20, № 6. – P. foaa042.
2. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries / C. Jain [et al.] // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9.
3. Gostinčar C. Towards Genomic Criteria for Delineating Fungal Species // JoF. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 246.
4. Lachance, M.-A. Delineating yeast species with genome average nucleotide identity: a calibration of ANI with haplontic, heterothallic *Metschnikowia* species / M.-A. Lachance, D.K. Lee, T. Hsiang // Antonie van Leeuwenhoek. – 2020. – Vol. 113, № 12. – P. 2097–2106.
5. Taxogenomic and Comparative Genomic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Focused on the Identification of Biosynthetic Clusters PKS and NRPS / N. Ramírez-Durán [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12.

Вирулентные бактериофаги *Staphylococcus aureus*: оценка литического потенциала и характеристика устойчивых штаммов

Корниенко М.А., Беспярых Д.А., Городничев Р.Б., Веселовский В.А.,
Шитиков Е.А.

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»,
Москва, Россия, электронный адрес: kornienkomariya@gmail.com

Нерациональное использование антибактериальных препаратов привело к возникновению и распространению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) среди патогенных бактерий. Бактерии вида *S. aureus* относят к группе наиболее клинически значимых микроорганизмов, характеризующихся МЛУ [1]. Надо отметить, что штаммы *S. aureus* вызывают широкий спектр патологий, начиная от инфекций мягких тканей и заканчивая тяжелыми заболеваниями с высоким риском летального исхода (эндокардит, менингит и сепсис) [2]. В связи с этим необходимо повышение эффективности терапии инфекций, вызванных штаммами *S. aureus* с МЛУ, за счет использования альтернативных антибиотикам схем, например, фаготерапии (применении вирулентных бактериофагов). Целью данного исследования является оценка спектров литической активности вирулентных стафилофагов семейств *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*, а также характеристика основных механизмов устойчивости штаммов *S. aureus* к исследуемым бактериофагам.

В рамках работы создана коллекция вирулентных стафилофагов семейств *Herelleviridae* ($n = 6$) и *Rountreeviridae* ($n = 4$). Спектр литической активности фагов оценивали на коллекции клинических штаммов *S. aureus* ($n = 158$), относящихся к 39 различным сиквенс-типам по данным мультилокусного секвенирования-типирования и обладающих МЛУ (37,3 % штаммов). Стафилофаги семейств *Herelleviridae* имели более широкий спектр активности (70,0–71,5 %), чем фаги *Rountreeviridae* (49,4–52,1 %). При составлении потенциального терапевтического коктейля из исследуемых бактериофагов обоих семейств удалось достигнуть лизиса 81,6 % штаммов коллекции.

Штаммы, устойчивые к фагам *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*, относились к 22 сиквенс-типам (наиболее представленные: ST398, ST239, ST5) и 26 сиквенс-типам (наиболее представленные: ST8, ST5, ST398) соответственно. Штаммы, одновременно устойчивые к фагам обоих семейств, имели сиквенс-типы ST239, ST398 и ST5.

Для изучения механизмов устойчивости были получены данные полногеномного секвенирования штаммов *S. aureus* ($n = 34$), характеризующихся

разной чувствительностью к стафилофагам. Фагоспецифические рецепторы *S. aureus* наиболее часто представлены тейхоевыми кислотами [3], в связи с чем выполнен анализ профилей 22 генов синтеза тейхоевых кислот, показавший различия в представленности генов *tarP* и *tarM*. Для увеличения выборки проведен дополнительный ПЦР анализ наличия данных генов у штаммов коллекции, показавший наличие корреляции между устойчивостью штаммов к фагам *Rountreeviridae* и наличием гена *tarP*. В случае гена *tarM* ранее высказывалась гипотеза, что совместное наличие генов *tarS* и *tarM* ведет к формированию устойчивости [4]. Полученные результаты гипотезу не подтвердили.

Помимо анализа генов синтеза фагоспецифических рецепторов, рассмотрены возможные внутриклеточные механизмы устойчивости: проведен анализ генов систем рестрикции-модификации, CRISPR локусов и профагов. Корреляции между наличием генов системы рестрикции-модификации I, II и III типа с устойчивостью к стафилофагам найдено не было. Подтвержденные CRISPR локусы найдены в одном геноме чувствительного к стафилофагам штамма. Все исследуемые геномы содержали профаги ($n = 65$; от 1 до 9 регионов), относящиеся к типам Sa1, Sa2, Sa3, Sa7 и Sa9. Наиболее представлены были профаги типа Sa3 (32/65; 49,2 %). Корреляции между устойчивостью к фагам семейства *Herelleviridae* и *Rountreeviridae* и типом профагов не выявлено.

Таким образом, фаготерапия стафилококковых инфекций представляется перспективным вариантом борьбы со штаммами, характеризующимися МЛУ. В тоже время вызывает опасение формирование устойчивости штаммов *S. aureus*, что требует детального изучения.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Список использованных источников

1. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects / T.M. Uddin [et al.] // J. Infect. Public Health. – 2021. – Vol. 14, № 12. – P. 1750–1766.
2. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management / S.Y.C. Tong [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28. – P. 603–661.
3. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria / M. León [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 343.
4. Determinants of Phage Host Range in Staphylococcus Species / A.G. Moller [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2019. – Vol. 85, № 11. – P. e00209-19.

Анализ штаммов-деструкторов бифенила, выделенных из антропогенно загрязненных экотопов

Королев Н.А., Егорова Д.О.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия,
электронный адрес: nicolay.korolyov@outlook.com*

Одним из стойких органических загрязнителей является бифенил и его хлорированные производные – полихлорированные бифенилы (ПХБ). Данная группа веществ обладает канцерогенными свойствами, а также негативно влияет на все системы органов человека при длительном воздействии. К настоящему времени в энергосистемах и других отраслях промышленности находится около 10 тыс. трансформаторов и 500 тыс. конденсаторов, в которых в качестве диэлектрика используется ПХБ. Общий объем ПХБ в этих устройствах оценивают в 30 тыс. т [1]. В результате неправильной эксплуатации, а также нарушений при транспортировке и хранении значительная часть ПХБ попала в объекты окружающей среды. ПХБ устойчивы к физическому и химическому воздействию, однако подвергаются биологической трансформации [2]. В связи с этим использование микроорганизмов для деструкции и ускорения процесса избавления от данных токсикантов является актуальным.

Цель работы – выделение новых штаммов бактерий из техногенно загрязненных биотопов и изучение их деструктивного потенциала в отношении бифенила как модельного соединения.

Образцы почв были отобраны на территории ОАО «СВХЗ» г. Чапаевск Самарской области. В результате накопительного культивирования с бифенилом как селективным фактором были получены ассоциации бактерий, из которых выделены 10 индивидуальных штаммов, способных осуществлять деструкцию бифенила.

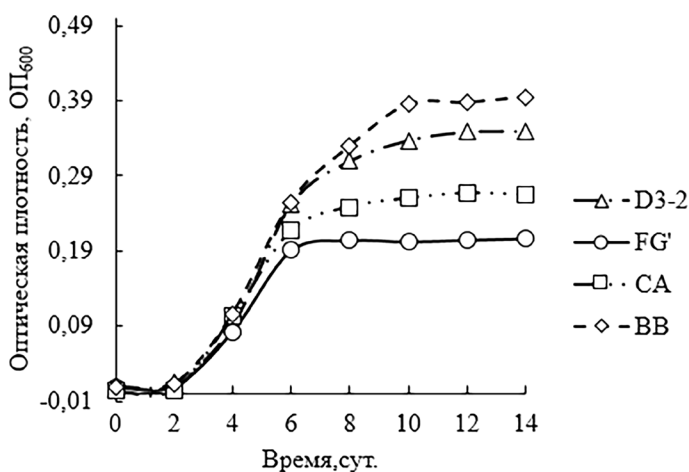
В результате анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено, что 7 штаммов являются представителями класса *Fermicutes*, порядка *Bacillales*, семейства *Bacillaceae*. Из них 3 штамма принадлежат роду *Brevibacterium*, а 4 штамма – роду *Bacillus*. Один из отобранных штаммов-деструкторов является представителем рода *Achromobacter* (класс *Betaproteobacteria*, порядок *Burkholderiales*, семейство *Alcaligenaceae*). Для двух штаммов филогенетическая принадлежность не выявлена.

Установлено, что удельная скорость роста штаммов при использовании бифенила как единственного источника углерода варьировала от 0,16 до 0,48 сут⁻¹ (см. таблицу). В результате анализа динамики увеличения биомассы отобранных штаммов показано, что наиболее активно штаммы растут в пе-

риод 2–6 сут культивирования (штаммы *Brevibacterium* sp. CA, *Brevibacterium* sp. FG' и штамм D3-2), тогда как штамм BB эффективно наращивает биомассу в период 2–10 сут культивирования (см. рисунок).

Удельная скорость роста штаммов в среде K1, содержащей в качестве единственного источника углерода бифенил

Штамм	Удельная скорость роста, сут ⁻¹	Штамм	Удельная скорость роста, сут ⁻¹
DI-2	0,1639	DI-1	0,2459
HE	0,1701	CA	0,2842
FG	0,1983	BB	0,3158
FG'	0,2254	D3-2	0,3184
AA1	0,2259	AF	0,4839



Динамика роста штаммов в минеральной среде K1 с бифенилом

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены новые штаммы, способные активно использовать бифенил в качестве источника углерода. Полученные результаты позволяют предположить, что данные штаммы перспективны для дальнейшего анализа с целью разработки основы биопрепарата, направленного на уничтожение бифенила и ПХБ.

Исследование выполнено в рамках госзадания N AAAA-A19-119113290009-1 Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды.

Список использованных источников

1. Производство ПХБ в России [Электронный ресурс] // Энциклопедия СОЗ, С.20. URL: <https://stoppcb.ru/ru/pages/20/> (Дата обращения: 25.03.2023).
2. Химическая функционализация полихлорированных бифенилов: новые достижения / Т.И. Горбунова [и др.] // Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2018. – 728 с.

Скрининг стрессоустойчивых бактерий рода *Bacillus*, обладающих антимикробной активностью

Купцов В.Н., Мандрик-Литвинкович М.Н., Левченко Д.Д., Коломиец Э.И.

*Государственное научно-производственное объединение
«Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: gnpo@biotech.bas-net.by*

Химические пестициды, широко используемые на протяжении длительного времени в интенсивном земледелии, привели к ряду неблагоприятных последствий: появление устойчивых форм фитопатогенов, загрязненность почв и негативное влияние на здоровье человека. В связи с этим на сегодняшний день достаточно актуален вопрос селекции новых штаммов микроорганизмов для разработки экологически безопасных биопрепаратов для сельского хозяйства. Бактерии рода *Bacillus* выгодно выделяются ввиду наличия спор, позволяющих выживать при неблагоприятных факторах окружающей среды, таких как действие высоких температур, засоленность и защелаченность почв, что делает их одними из самых используемых микробных объектов биологической защиты растений [1, 2].

Цель работы – отбор и изучение штаммов *Bacillus* spp. с выраженными стрессоустойчивостью и антимикробным действием как основа для разработки микробных препаратов нового поколения для защиты сельскохозяйственных культур.

Из образцов грунта, отобранного у подножия солеотвала ОАО «Беларуськалий», а также из образцов почв, собранных на территории Узбекистана, были выделены 20 бактериальных изолятов (см. таблицу). Отбор солеустойчивых штаммов проводили путём посева на твёрдые питательные среды с содержанием соли 7, 12 и 15 % соответственно. Установлено, что все штаммы обладают способностью к росту при концентрации соли 7 %; штаммы Bhs-2, Bhs-3, Bhs-5, Bhs-6, Bhs-7, Bhs-8, Bhs-9, Bhs-10, Bhs-16, Bhs-18, Bhs-19, Bhs-20 растут при содержании в среде NaCl 12 %; штаммы Bhs-4, Bhs-17 характеризовались наибольшими показателями солеустойчивости (15 %). Кроме того, в ходе скрининга были отобраны 3 культуры термофильных бактерий Bhs-1, Bhs-3 и Bhs-7, способных расти при 55 °С. Среди изученных изолятов бактерий выделены алкалофильные микроорганизмы. Часть изученных бацилл (Bhs-4...Bhs-6, Bhs-10...Bhs-16, Bhs-18) были способны к росту на средах со значением pH 9; штаммы Bhs-1... Bhs-3, Bhs-7... Bhs-9, Bhs-17... Bhs-19, Bhs-20 оказались наиболее щелочеустойчивыми (pH 10). Антагонистическую активность отобранных стрессоустойчивых бактерий оценивали методом лунок по диаметру зон задержки роста фитопатогенов. В результате было показано, что все штаммы проявляют высокую антагонистическую активность в отноше-

нии тест-культуры бактерий *Pseudomonas syringae*, задерживая рост патогена (8–30 мм). Три штамма Bhs-1, Bhs-3 и Bhs-17 ингибировали развитие гриба *Fusarium oxysporum*, образуя зоны задержки роста размером 15–21 мм.

Физиологические характеристики стрессоустойчивых штаммов рода *Bacillus*

Штамм	Рост при различных концентрациях NaCl, %			Рост при 55 °С	Рост при разных значениях pH			Диаметр зоны задержки роста тест-культуры, мм	
	7	12	15		8	9	10	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Bhs-1	+	+	–	+	+	+	+	20,0 ± 0,3	15,0 ± 0,2
Bhs-2	+	+	–	–	+	+	+	19,0 ± 0,2	–
Bhs-3	+	+	–	+	+	+	+	17,0 ± 0,4	20,0 ± 0,3
Bhs-4	+	+	+	–	+	+	–	8,0 ± 0,1	–
Bhs-5	+	+	–	–	+	+	–	17,0 ± 0,1	–
Bhs-6	+	+	–	–	+	+	–	22,0 ± 0,2	–
Bhs-7	+	+	–	–	+	+	+	30,0 ± 0,5	–
Bhs-8	+	+	–	–	+	+	+	30,0 ± 0,3	–
Bhs-9	+	+	–	–	+	+	+	30,0 ± 0,4	–
Bhs-10	+	+	–	–	+	–	–	30,0 ± 0,3	–
Bhs-11	+	–	–	–	+	–	–	22,0 ± 0,2	–
Bhs-12	+	–	–	–	+	–	–	23,0 ± 0,1	–
Bhs-13	+	–	–	–	+	–	–	24,0 ± 0,3	–
Bhs-14	+	–	–	–	+	–	–	24,0 ± 0,2	–
Bhs-15	+	+	+	–	+	–	–	16,0 ± 0,2	–
Bhs-16	+	+	–	–	+	–	–	22,0 ± 0,3	–
Bhs-17	+	+	–	+	+	+	+	19,0 ± 0,2	21,0 ± 0,2
Bhs-18	+	+	–	–	+	–	–	18,0 ± 0,3	–
Bhs-19	+	+	–	–	+	+	+	17,0 ± 0,4	–
Bhs-20	+	+	–	–	+	+	+	16,0 ± 0,2	–

Пр и м е ч а н и е. «+» – рост наблюдается; «–» – рост отсутствует.

Таким образом, в ходе исследования были отобраны стрессоустойчивые штаммы с антибактериальным и антифунгальным действием, что позволит в дальнейшем использовать их для контроля возбудителей болезней растений в экстремальных условиях. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ по договору № Б22КИТГ-022.

Список использованных источников

1. Факторы антагонистической активности штамма *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* БИМ В-439Д / А.В. Бережная [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси ; под ред. Э.И. Коломиец, А.Г. Лобанка. – Минск, 2014. – Т. 6. – С. 136–149.
2. Aleschenkova Z. Nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria resistant to technogenic soil salinization / Z. Aleschenkova, N. Naumovich, U. Kuptsov // J. Microb. Biochem. Technol. – 2017. – Vol. 9, iss. 6. – P. 112.

***Aspergillus* sp. – продуценты протеаз, специфичных в отношении определённых глобулярных и фибриллярных белков**

Лавренова В.Н.¹, Суркова Д.Е.^{1,2}, Шестакова А.А.^{1,2}, Осмоловский А.А.^{1,2}

¹Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, электронный адрес: pkviktoria@mail.ru

²Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

Для эффективного освоения среды обитания микромицеты секретируют целый ряд химических веществ, включающих в себя гидролитические ферменты и вторичные метаболиты. Особым разнообразием среди секретируемых гидролаз отличаются протеазы, так как многообразие белков живых организмов, которые потенциально могут быть использованы как питательные субстраты, очень велико. Среди белков, расщепляемых протеазами микромицетов, могут быть как глобулярные, так и фибриллярные. Изучение продуцентов протеаз, специфичных к глобулярным, а также к таким фибриллярным белкам, как кератин и коллаген, актуально для исследований в области биodeградации, протеазы, специфичные к фибрину, могут быть использованы в медицине в качестве тромболитиков.

Цель работы – изучение протеолитического потенциала 22 видов рода *Aspergillus* в отношении двух глобулярных (казеин, гемоглобин), трёх фибриллярных белков (кератин, фибрин, фибриноген), а также в отношении желатина, являющегося продуктом частичной деградации фибриллярного белка коллагена. Оценка протеолитической активности видов *Aspergillus* проводилась спустя 7 суток после культивирования при 28°C в темноте на чашках Петри со средой, содержащей определённый белок, путём определения энзиматического индекса, то есть отношения диаметра колонии микромицета к диаметру зоны гидролиза белка. Значения энзиматических индексов больше 1 свидетельствуют о присутствии протеолитической активности (см. таблицу).

По результатам экспериментов казеинолитическая активность была обнаружена у 20 из 22 исследуемых видов, что неудивительно, так как аминокислотный состав казеина позволяет большинству известных протеаз эффективно расщеплять этот белок. Желанолитическая активность была обнаружена у 18 изучаемых видов, гемоглобинолитическая – у 11, фибринолитическая – у 16, фибриногенолитическая – у 15, кератинолитическая – у 6 видов. Многие исследованные микромицеты выделяли протеазы с низкой специфичностью по отношению к белковым субстратам, например, протеазы *A. melleus* были активны в отношении всех 6 изучаемых белков, а протеазы *A. aureolatus*, *A. calidoustus*, *A. creber*, *A. domesticus*, *A. jensenii*, *A. penicilloides* и *A. protuberus*

расщепляли 5 из 6 исследованных белков, что говорит о большом потенциале указанных видов для биодеградации. Протеазы *A. domesticus*, *A. penicilloides* и *A. ruber* были высокоактивны в отношении кератина. Протеазы *A. caespitosus*, *A. creber*, *A. domesticus*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. penicilloides*, *A. protuberus*, *A. tabacinus*, *A. tamarii*, *A. tennesseensis* были высокоактивны по отношению к фибриногену, а протеазы *A. amstelodami*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. ruber*, *A. tabacinus*, *A. tamarii*, *A. wentii* – достаточно активны по отношению к фибрину. При этом виды *A. amstelodami*, *A. caespitosus*, *A. glaucus*, *A. ruber*, *A. wentii* не секретировали протеазы, расщепляющие гемоглобин, что может свидетельствовать об отсутствии побочных эффектов расщепления гемоглобина при применении препаратов данных секретируемых протеаз парентерально.

Таким образом, в ходе данной работы были выявлены новые потенциальные продуценты протеаз, перспективных для биодеградации и медицины.

Энзиматические индексы 22 видов *Aspergillus* по отношению к разным белковым субстратам

Вид	Энзиматический индекс по отношению к конкретному белку					
	Казеин	Желатин	Гемоглобин	Фибрин	Фибриноген	Кератин
<i>A. amstelodami</i>	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. athecicus</i>	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. aureolatus</i>	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>A. caespitosus</i>	3,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,4	1,2 ± 0,0
<i>A. calidoustus</i>	1,5 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. creber</i>	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>A. domesticus</i>	4,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	2,5 ± 0,5	1,1 ± 0,0	3,0 ± 0,6	1,7 ± 0,1
<i>A. europaeus</i>	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,8	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. glaucus</i>	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>A. jensenii</i>	2,2 ± 0,6	3,4 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0
<i>A. melleus</i>	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,6	1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,1
<i>A. penicilloides</i>	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,4
<i>A. phoenicis</i>	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. proliferans</i>	1,0 ± 0,0	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. protuberus</i>	3,1 ± 0,4	3,7 ± 0,8	2,0 ± 0,3	1,1 ± 0,0	2,6 ± 0,4	1,0 ± 0,0
<i>A. pseudoglaucus</i>	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. ruber</i>	3,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,3
<i>A. tabacinus</i>	2,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>A. tamarii</i>	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>A. tennesseensis</i>	2,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0
<i>A. tubingensis</i>	1,1 ± 0,0	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<i>A. wentii</i>	1,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Список использованных источников

1. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential / A. Verma [et al.] // Crit. Rev. Biotechnol. – 2017. – Vol. 37. – P. 476–491.
2. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry / P. Chanalia [et al.] // Rev. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 22. – P. 96–101.

Анализ экспрессии генов феназинового оперона у бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* на стадиях транскрипции и трансляции

Левданская А.И., Веремеенко Е.Г.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tassigo@gmail.com

Бактерии рода *Pseudomonas* способны к синтезу феназиновых соединений, образующихся в ходе реакций шикиматного метаболического пути, катализируемого продуктами генов феназинового оперона (*phz*-оперона) [1]. В геноме бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 (код доступа CP050510.1) оперон представлен семью структурными генами: *phzABCDEFG*.

Ранее на кафедре генетики биологического факультета БГУ на основе штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162 были получены продуценты феназиновых соединений, способные к сверхсинтезу этих метаболитов не только на полноценной (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/255), но и на минимальной среде (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/17). Уровень синтеза феназинов на полноценной среде для штаммов В-162 и В-162/255 составляет 75 ± 15 мг/л и 420 ± 30 мг/л, соответственно. У штамма В-162/17 уровень синтеза как на полноценной, так и на минимальной среде составляет 210 ± 25 мг/л [2].

Перечисленные выше штаммы культивировали на полноценной и минимальной средах в течение 12, 18, 24 часов (логарифмическая стадия), а также 4, 5 и 6 дней (стационарная фаза). Из полученных образцов выделялась РНК, которую использовали для количественной ПЦР всех генов оперона [3]. Параллельно проводилось выделение белков для последующего протеомного анализа.

Несмотря на то, что все исследуемые гены объединены в оперон, наблюдается разный уровень экспрессии этих генов. На полноценной среде у штаммов В-162 и В-162/255 максимальное количество РНК *phzA*-гена наблюдается ближе к концу логарифмической фазы роста, в то время как белок активно накапливался к концу стационарной. РНК *phzB*-гена активно нарабатывается на ранних стадиях у всех трёх штаммов, в то время как высокое содержание белка регистрируется на 4–6-е сут только у штаммов В-162 и В-162/17. На достаточно высоком уровне держится как концентрация РНК, так и количество белка 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы (ДАГФ-синтазы), кодируемой *phzC*-геном у всех штаммов, достигая своего максимума к концу первых суток культивирования. РНК и белок, кодируемые *phzD*-геном, появляются и достигают своего максимума у штамма В-162/255 к 18 ч культивирования, в то время как у В-162/17 концентрация этого белка только начинает

расти и остается на высоком уровне к 4-м сут. Высокий уровень РНК гена *phzE* наблюдается к 12 ч инкубации, после этого к 18 ч у В-162/255 и к 1-м сут у В-162 регистрируется резкое увеличение содержания соответствующего белка. Высокий уровень белка, кодируемого *phzF*-геном, на 4–6-е сут культивирования и при этом относительно низкие концентрации его мРНК в логарифмической и стационарной фазах может быть объяснен активным образованием этой мРНК в фазе замедления роста. Высокое содержание РНК гена *phzG* к 12 ч культивирования у штамма В-162/255 коррелирует с постепенным накоплением белка к 1-м сут. Максимальное значение концентрации этого белка у В-162/17 приходится на середину логарифмической фазы роста, следовательно, РНК начинает нарабатываться в ее начале.

На минимальной среде штаммы В-162 и В-162/255 демонстрируют невысокое содержание большинства мРНК и белков *phz*-оперона, что согласуется с отсутствием продукционной активности данных штаммов в этих условиях. В то же время, у штамма В-162/17 наблюдаются очень высокие значения как РНК, так и белков, кодируемых всеми генами оперона, причем наибольшая экспрессия фиксируется в логарифмической фазы роста этих бактерий.

Несмотря на отсутствие различий в последовательностях генов оперона и прилегающих регуляторных областях, результаты для всех трёх штаммов отличаются. Это объясняется разным уровнем синтеза феназиновых соединений исследуемыми штаммами. Также результаты количественной ПЦР и протеомного анализа в большинстве случаев коррелируют друг с другом. На основании этого можно сделать вывод, что основные различия в экспрессии генов оперона могут быть объяснены его различной регуляцией, которая происходит на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях и может быть ассоциирована с частичной неравномерной деградацией мРНК *phz*-оперона.

Список использованных источников

1. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp biosynthesis and regulation / D.V. Mavrodi [et al.] // Annual Rev. of Phytopathology. – 2006. – Vol. 44. – P. 417–445.
2. Веремеенко Е.Г. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде / Е.Г. Веремеенко, В.В. Лысак, Н.П. Максимова // Вестн. Бел. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2010. – № 2. – С. 47–53.
3. Экспрессия феназинового оперона у штаммов *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162, способных к сверхсинтезу феназиновых соединений : сб. науч. тр. / А.И. Левданская [и др.] ; Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 31. – С. 93–101.

Видовое разнообразие псевдомонад, вызывающих болезни рыб в рыбоводческих хозяйствах Республики Беларусь

Леонович С.И.¹, Максимьюк Е.В.², Дегтярик С.М.², Сидоренко А.В.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

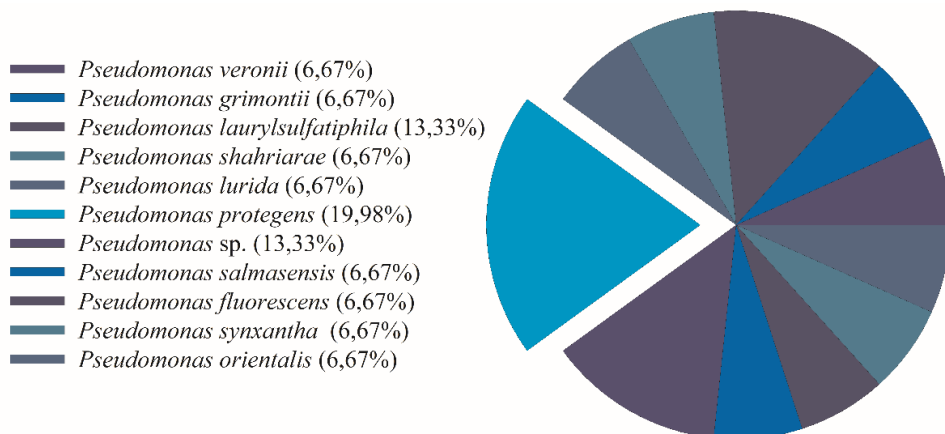
²РУП «Институт рыбного хозяйства», Минск, Беларусь

Рыбоводство является одним из наиболее быстрорастущих и экономически выгодных секторов производства продуктов питания. Инфекционные заболевания бактериальной этиологии могут приводить к массовой гибели выращиваемой рыбы и ухудшению качества рыбной продукции, нанося значительный экономический ущерб рыбным хозяйствам. Бактерии рода *Pseudomonas* широко распространены в водной среде и вызывают болезни различных видов рыб, такие как язвенный синдром и геморрагическая септицемия [1]. Исследователи сообщали о почти 100 % смертности радужной форели, морского леща, морского окуня и айю, выращиваемых в рыбоводческих хозяйствах, в результате инфицирования псевдомонадами. В настоящее время накоплены многочисленные сведения о видовом разнообразии патогенных и условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas*, обитающих в рыбоводных водоемах различных географических регионов. Аналогичные исследования в Республике Беларусь проводились с использованием культурально-морфологических и биохимических методов идентификации, которые не всегда позволяют точно определить видовую принадлежность псевдомонад. Цель данной работы – изучение видового разнообразия бактерий рода *Pseudomonas*, циркулирующих в рыбоводческих хозяйствах Республики Беларусь, с использованием многолокусного секвенирования.

Объектами исследования служили 15 штаммов псевдомонад, выделенных сотрудниками РУП «Институт рыбного хозяйства» в период с февраля 2019 г. по февраль 2023 г. из различных органов рыб с признаками инфекционных заболеваний. Исследуемая рыба была выловлена в рыбных хозяйствах Минской и Брестской областей. Идентификацию бактерий рода *Pseudomonas* осуществляли, используя в качестве филогенетических маркеров ген 16S рРНК, а также высококонсервативные гены *gyrB* (кодирует белок В субъединицы ДНК-гиразы) и *rpoD* (кодирует сигма-фактор 70 РНК-полимеразы).

Как видно из результатов, представленных на рисунке, штаммы псевдомонад, циркулирующие в водоемах Республики Беларусь, характеризовались широким видовым разнообразием. Наибольшее количество исследуемых штаммов относилось к видам *P. protegens* (19,98 %) и *P. laurylsulfatiphila* (13,33 %), в то время как виды *P. grimontii*, *P. veronii*, *P. shahriarae*, *P. lurida*, *P. salmasensis*,

P. fluorescens, *P. synxantha* и *P. orientalis* были представлены единичными штаммами. Еще два штамма, не смотря на использование нескольких филогенетических маркеров, были идентифицированы как *Pseudomonas* sp. (см. рисунок).



Спектр видов псевдомонад, выделенных от рыб с признаками бактериозов на территории Республики Беларусь

Полученные результаты подтверждают литературные данные, согласно которым способность вызывать заболевания рыб характерна для широкого спектра псевдомонад, что отличает их от других родов бактерий, для которых только отдельные виды описаны как патогенные. В настоящее время как возбудители болезней рыб идентифицированы *P. aeruginosa*, *P. anguilliseptica*, *P. baetica*, *P. brenneri*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. koreensis*, *P. lactis*, *P. lundensis*, *P. lurida*, *P. mandelii*, *P. migulae*, *P. meridiana*, *P. luteola*, *P. plecoglossicida*, *P. proteolytica*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P. simiae*, *P. weihenstephanensis*, и перечень патогенных видов постоянно расширяется.

Данные, полученные при многолокусном секвенировании, свидетельствуют о целесообразности использования этого метода для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*, поскольку нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК многих видов псевдомонад характеризуется высоким уровнем сходства и её сравнительный анализ не обладает достаточной разрешающей способностью для видовой дифференциации.

Список использованных источников

1. The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey / M. Duman [et al.] // Aquaculture. – 2021. – Vol. 535. – Art. 736369.

Литический потенциал штамма *Lysobacter gummosus* 10.1.1

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

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия, электронный адрес: ealeont@gmail.com*

Антибиотикорезистентность микроорганизмов является глобальной проблемой современности, поэтому поиск новых литических агентов, альтернативных антибиотикам, чрезвычайно актуален.

Перспективными антимикробными соединениями являются внеклеточные бактериолитические ферменты бактерий, гидролизующие пептидогликан – основной структурный компонент клеточных стенок бактерий, приводя к лизису клеток-мишеней. Поиск продуцентов бактериолитических ферментов, их характеристика, выделение целевых белков с целью их изучения в качестве лекарственной основы имеет очевидную значимость.

В ИБФМ РАН изучаются бактерии рода *Lysobacter*, продуцирующие антимикробные агенты различной природы. К настоящему времени известно, что литически активными видами являются: *Lysobacter gummosus*, *Lysobacter capsisci*, *Lysobacter antibioticus* и *Lysobacter enzymogenes*. Эти виды входят в одну антимикробную кладу при филогеномном сравнении со всеми представителями рода *Lysobacter*. Наиболее изученными являются *L. enzymogenes* и *L. capsisci*. Несмотря на то, что *L. gummosus* довольно хорошо известен, литические свойства штаммов этого вида, а также особенности продукции антимикробных агентов и их характеристика представлены в литературе скудно или отсутствуют вовсе.

Целью настоящей работы стало изучение литического потенциала штамма *L. gummosus* 10.1.1 и поиск перспективных генов-кандидатов бактериолитических ферментов. Штамм *L. gummosus* 10.1.1 был любезно предоставлен доктором Джоук Постмой (Нидерланды).

Известно, что среды культивирования влияют на продукцию литических агентов. При культивировании *L. gummosus* 10.1.1 на разных средах оказалось, что оптимальной для проявления литических свойств является среда RM. На этой среде максимальные значения бактериолитической активности культуральной жидкости наблюдались к 19 часам культивирования (конец экспоненциальной фазы роста). Бактериолитическую активность измеряли турбидиметрическим методом и методом спот-теста. Активность была обнаружена в отношении живых клеток *Staphylococcus aureus* 209P, *Micrococcus luteus* Ac – 2230^T, *Bacillus cereus* 217, *Kocuria rosea* Ac – 2200^T. При культивировании бактерии на среде 5/5 бактериолитическая активность отсутствовала.

Для поиска перспективных бактериолитических ферментов был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов. Для этого штамм *L. gummosus* 10.1.1 культивировали на среде RM в течение 19 ч. В качестве референса использовали *L. gummosus* 10.1.1, который культивировали на среде 5/5 в течение 19 ч. Секвенирование препаратов РНК было выполнено на платформе Illumina HiSeq 4000. В ходе анализа было получено количество прочтений, позволяющее провести подсчет дифференциальной экспрессии генов. Проведенный транскриптомный анализ позволил выявить пул генов бактериолитических и антифунгальных ферментов: 24 гликозил-гидролазы и 26 протеаз. Среди идентифицированного пула генов были B1p, GluB и хитиназа, которые увеличили свою экспрессию в 4, 343 и 5 раз соответственно. Также мы наблюдали значительное увеличение экспрессии генов (в 116 раз), кодирующих антифунгальный фактор HSAF.

В дальнейшем бактериолитические ферменты *L. gummosus* 10.1.1 будут выделены и охарактеризованы. Новые бактериолитические ферменты могут стать основой для создания антимикробного лекарственного препарата, эффективного в отношении патогенов, устойчивых к антибиотикам.

Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор контракта RF-193 021X0 001).

Выделение грибов рода *Cladosporium* из пораженных строительных материалов и разработка праймеров для их идентификации

Максимова А.М., Светлова А.С., Арашкова А.А.

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: anglnmksmva@gmail.com

Грибы рода *Cladosporium*, в том числе в ассоциации с другими микроорганизмами, способны развиваться в условиях дефицита питательных веществ, что позволяет им колонизировать строительные материалы, включая штукатурку, бетон и кирпич [1]. Микологическое поражение материалов в помещениях является фактором риска для здоровья людей, поскольку приводит к повышению концентрации спор, которые глубоко проникают в дыхательную систему человека и вызывают аллергические реакции [2, 3]. Своевременное выявление очагов биоповреждений и определение таксономической принадлежности плесневых грибов является важной составляющей микробиологического контроля помещений.

Целью данного исследования являлось выделение грибов рода *Cladosporium* из очагов плесневого поражения строительных материалов, получение образцов ДНК и разработка праймеров для дальнейшей диагностики видов.

Выделение микромицетов проводили из проб и образцов материалов с признаками плесневого поражения, полученных при проведении микологических обследований жилых помещений. Родовую принадлежность изолятов определяли на основании культурально-морфологических свойств. Геномную ДНК из биомассы грибов выделяли ЦТАБ-методом [4]. Для обнаружения вида *C. cladosporioides* осуществляли ПЦР-анализ с видоспецифичными праймерами CClad4-F/CClad4-R [5]. Электрофоретический анализ ДНК проводили в 1 %-ном агарозном геле. Дизайн праймеров осуществляли с помощью программного обеспечения Primer3. Для исключения образования вторичных структур, определения температуры плавления и GC-состава разработанные олигонуклеотиды анализировали на веб-сервере UniFold. Специфичность праймеров оценивали с помощью сервиса NCBI Primer BLAST.

В результате изучения макро- и микроморфологических особенностей грибов, выделенных из пораженных строительных материалов, было идентифицировано 9 штаммов, относящихся к роду *Cladosporium*. Проведение ПЦР-анализа с праймерами CClad4-F/CClad4-R установило отсутствие среди анализируемых грибов широко распространенного вида *C. cladosporioides*. В связи с этим для дальнейшего определения видовой принадлежности культур были начаты работы по созданию праймеров для ПЦР-диагностики других видов рода *Cladosporium*.

На данном этапе исследований осуществлен компьютерный дизайн праймеров для группы видов *C. herbarum* (к внутреннему транскрибируемому спейсеру ITS), для близкородственных видов *C. psychrotolerans* и *C. langeronii* (к гену *tefl* фактора элонгации трансляции 1-альфа), для вида *C. sphaerospermum* (к гену *actA* актина). Проведенный *in silico* анализ подобранных праймеров показал, что олигонуклеотиды не образуют вторичных структур, димеров, содержание GC-пар не превышает 60 %, температура плавления составляет 58–59 °C (см. таблицу).

Характеристика праймеров, полученных путем компьютерного дизайна

Целевой объект	Последовательность праймеров	Размер целевого продукта, п. н.	T _{пл} , °C	GC, %
<i>C. herbarum</i>	F:5' GCTTCGGCCTGGTTATTTCAT 3'	105	58	50
	R:5' ACGCAAGAGTTTGAAGTGTCC 3'		59	48
<i>C. psychrotolerans</i> <i>C. langeronii</i>	F:5' TCGACAGACAAACAACAGCG 3'	185	59	50
	R:5' GGGGTCTCGAACTTCCAGAG 3'		59	60
<i>C. sphaerospermum</i>	F:5' AGACACCTGTTCACTCCCC 3'	150	59	55
	R:5' GCGCGGAAGGTTAGAAACAT 3'		59	50

В дальнейшем разработанные пары праймеров будут проходить экспериментальную проверку на эффективность при проведении ПЦР.

Список использованных источников

1. О специфичности действия биоцидов на микроорганизмы, вызывающие биоповреждения пористых строительных материалов / Б.Н. Огарков [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. – 2013. – Т. 6, № 2. – С. 144–152.
2. Comparison of the allergenic potency of spores and mycelium of *Cladosporium* / Н. Bouziane [et al.] // Allergol. et Immunopathol. – 2005. – № 33 (3). – P. 125–130.
3. Микологическое поражение материалов в помещениях как фактор риска для здоровья полярников / Д.Ю. Власов [и др.] // Гигиена и санитария. – 2019. – № 98 (1). – С. 17–21.
4. Оптимизация условий выделения ДНК из грибов рода *Aspergillus* для последующей молекулярно-генетической идентификации / И.А. Гончарова [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – 2016. – Т. 8. – С. 62–72.
5. ПЦР-диагностика грибов – возбудителей болезней огурца и томата / А.А. Барейко [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – 2019. – Т. 11. – С. 200–215.

Влияние углеродных нанотрубок на биопленкообразование бактерий окружающей среды

Максимова Ю.Г.

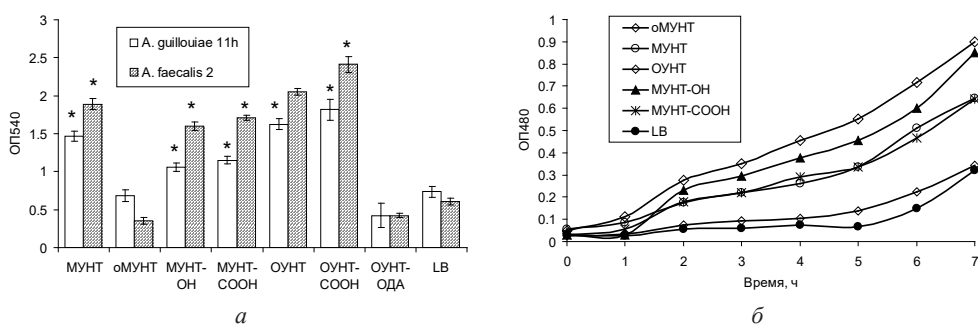
*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал
Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия,
электронный адрес: yul_max@mail.ru*

Биопленки – естественная форма существования бактерий в окружающей среде. В отличие от свободноплавающих клеток адгезированные на поверхности раздела фаз микробные сообщества покрыты полимерным матриксом собственного производства [1]. Бактерии в биопленке защищены от внешних воздействий и обладают устойчивостью к антимикробным веществам, отличной от таковой планктонных клеток.

В последнее десятилетие особое внимание уделяют углеродным наноматериалам, а именно углеродным нанотрубкам (УНТ), в связи с их массовым производством и широким применением в различных отраслях промышленности [2]. Крупномасштабное использование приводит к попаданию этих наночастиц (НЧ) в окружающую среду, в связи с чем возникает вопрос об их влиянии на живые организмы. Сточные воды, содержащие НЧ, обрабатываются в аэротенках, при этом для эффективного процесса очистки стоков необходимо сохранение жизнеспособности микроорганизмов активного ила. Однако большое количество опубликованных данных свидетельствуют о том, что УНТ обладают антимикробным действием, которое зависит от их размеров, свойств и функционализации [3]. В связи с этим целью работы явилось изучение влияния многостенных (МУНТ) и одностенных (ОУНТ) углеродных нанотрубок на жизнеспособность и биопленкообразование бактерий активного ила и штаммов актинобактерий, перспективных для биологической очистки.

В работе использовали штаммы грамотрицательных бактерий, ранее выделенные из активного ила очистных сооружений *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Burkholderia dolosa* БОС, *Pseudomonas fluorescens* С2 и грамположительные бактерии, ранее выделенные из почвы: *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО, *R. erythropolis* 11-2, *R. ruber* gt1. МУНТ («Таунит-М», ООО «НаноТехЦентр», Россия) имели внешний / внутренний диаметр (d) 10–30 / 5–15 нм. Функционализированные МУНТ имели внешний / внутренний d 20–50 / 10–20 нм. Олеофильные МУНТ (оМУНТ) были модифицированы остатками жирных кислот до 15 мас. %, гидрофильные МУНТ (МУНТ-ОН) содержали -ОН и -СООН группы, карбоксилированные МУНТ (МУНТ-СООН) – 0,1–1,0 ммоль/г СООН-групп. ОУНТ («TUBALL™», OCSiAl, Россия) имели внешний d $1,6 \pm 0,4$ нм.

Биомассу бактериальных биопленок определяли на среде LB с УНТ. Показано, что по сравнению с контролем МУНТ и оМУНТ вызывает достоверное увеличение биопленкообразования *R. erythropolis* ИЛБИО, *P. fluorescens* C2, *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2; МУНТ-ОН и МУНТ-СООН – *P. fluorescens* C2, *A. guillouiae* 11h, *A. faecalis* 2 и *B. dolosa* БОС. Установлено, что ОУНТ в среде культивирования не оказывали антибактериального действия в отношении изученных родококков и протеобактерий активного ила, не ингибировали образование биопленок изученных бактерий и значительно усиливали биопленкообразование *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2 (см. рисунок, а). Метаболическая активность таких биопленок была выше контрольной, из чего можно заключить, что бактерии образовывали более массивные биопленки и не теряли своей жизнеспособности в зрелой биопленке.



Биомасса биопленок, определенная по оптической плотности (ОП540) экстрагированного кристаллического фиолетового (а) и метаболическая активность биопленок *A. guillouiae* 11h, определенная по окраске реагентом ХТТ при ОП480 (б)

Таким образом, биопленки изученных бактериальных культур, выращенные в присутствии УНТ, были более массивны и метаболически активны, чем биопленки, выращенные на среде LB без добавок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-44-596 002.

Список использованных источников

1. Flemming, H.-C. The biofilm matrix / H.-C. Flemming, J. Wingender // Nature Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 623–633.
2. A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics / H.J. Johnston [et al.] // Nanotoxicology. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 207–246.
3. Kang, S. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! / S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech // Langmuir – 2008. – Vol. 24. – P. 6409–6413.

Облигатный метанотроф *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z как продуцент фумарата: генетические и биохимические аспекты

Мельников О.И., Егорова С.В., Розова О.Н.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия, электронный адрес: rozovaolgal@rambler.ru*

Аэробные облигатные метанотрофы – уникальная группа бактерий, использующая метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Ассимиляция углерода у *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z происходит на уровне формальдегида через рибулозомонофосфатный (РМФ) путь. Поскольку основным источником энергии у данного метанотрофа являются реакции последовательного окисления метана до CO_2 , следовательно, цикл Кребса у метанотрофов не несет той энергетической нагрузки, как у большинства аэробных бактерий. Фумараза является ферментом цикла Кребса, катализируя гидратацию фумарата с образованием малата. Фумараза в живом мире представлена двумя биохимически различными классами I и II. В отличие от фумараз II класса, фумаразы класса I обладают 4Fe-4S кластером в активном центре, в следствии чего являются чувствительными к кислороду. В данной работе нами были изучены свойства рекомбинантных фумараз I и II из галоалкалофильного метанотрофа *M. alcaliphilum* 20Z, а также получен делеционный штамм 20Z-3E и охарактеризованы его физиологические характеристики.

Фумараза II из *M. alcaliphilum* обратимо катализировала превращение фумарата в малат с максимальной активностью 45 Е/мг белка в обоих направлениях. Фермент работал в широком диапазоне рН (от 6 до 9) с оптимум рН 8,5 в реакции гидратации фумарата и рН 8,0 в обратном направлении. Температурный оптимум фермента составил 50°C. При оптимальном рН и 30 °С (оптимум роста культуры) значение кажущейся K_m для фумарата составило $(0,11 \pm 0,04)$ мМ. В реакции дегидратации малата фермент не подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен, коэффициент Хилла n составил $2,1 \pm 0,4$, а константа $S_{0,5}$ для малата – $(0,14 \pm 0,01)$ мМ. Фосфоенолпируват и цитрат ингибировали активность фермента на 30 и 50 %, соответственно.

Фумараза I в 2 раза более активна в реакции с фумаратом, чем с малатом (94 Е/мг белка против 50 Е/мг белка), а также способна гидратировать мезаконат (81 Е/мг белка). Оптимумы рН и температуры для фермента составили 8,5 и 30 °С. Кинетика фермента не подчинялась уравнению Михаэлиса-Ментен, значение $S_{0,5}$ для фумарата составило $(0,28 \pm 0,04)$ мМ, коэффициент Хилла $n = 1,4 \pm 0,2$, для малата – $(0,55 \pm 0,03)$ мМ, $n = 1,7 \pm 0,1$. Расчет $k_{cat}/S_{0,5}$ показал, что фумараза I *M. alcaliphilum* в 4 раза специфичнее к фумарату и мезаконату,

чем к малату. Физиологического значения реакции с мезаконатом для метанотрофов не обнаружено, вероятно, это общее свойство ферментов данного класса.

Фумаразы I и II у *M. alcaliphilum* не являются гомологичными ферментами и проявляют всего 10 % идентичности транслированных аминокислотных последовательностей. Фумараза I *M. alcaliphilum* имеет 70 % идентичности с ферментом из *Burkholderia xenovorans*. Фумараза II класса обширнее представлена у метанотрофов по сравнению с фумаразой I класса.

Мутантный штамм 20Z-3E, с инактивированными генами *fumI*, *fumII* и *sfc*, кодирующими фумаразы I и II класса, а также малик-фермент, соответственно, имел в 1,5 раза ниже скорость роста и выделял в культуральную жидкость фумарат в концентрации 2,6 ммоль на грамм сухой биомассы. Отсутствие фумарата в культуральной жидкости у двойных мутантных штаммов с генотипами $\Delta fumI\Delta sfc$ и $\Delta fumC\Delta sfc$ свидетельствует о взаимозаменяемости двух форм фумараз. Теоретически цикл Кребса может работать без фумараз, восполняя пул ОА в анаэробных реакциях, катализируемых ФФн-ФЕП-карбоксиназой, обратимо карбоксилирующей ФЕП до оксалоацетата, или двухсубъединичной биотинзависимой пируваткарбоксилазой. При этом избыток фумарата может перейти в аспартат посредством работы ферментов аденилосукцинатсинтазы и аденилосукцинатлиазы. Дополнительное выключение гена малик-фермента, катализирующего необратимое окислительное декарбоксилирование малата в пируват с использованием НАД⁺ в качестве кофактора, на фоне делетированных генов фумаразы привело к повышению концентрации промежуточных продуктов цикла Кребса, особенно фумарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 23-24-00 497.

Ферменты пути утилизации маннита у метилотрофа *Methylobrevia pamukkalensis* PK2

Мельников О.И., Розова О.Н.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия, электронный адрес: oleg96mel@gmail.com*

Факультативный метилотроф *Methylobrevia pamukkalensis* PK2 является представителем нового семейства *Pleomorphomonadaceae* класса *Alphaproteobacteria*. Данный микроорганизм является интересным объектом для изучения, благодаря своей способности расти не только на метаноле, но и на С6 сахарном спирте манните и ряде простых сахаров. *M. pamukkalensis*, как и все известные на данный момент метилотрофы класса *Alphaproteobacteria*, использует сериновый путь С1 ассимиляции. Анализ генома *Mb. pamukkalensis* PK2 выявил небольшой кластер, включающий в себя гены транспортной системы маннита и маннит-2-дегидрогеназы (МТД), предположительно обеспечивающий ферментативную основу окисления маннита до фруктозы. Затем фруктоза фосфорилируется до фруктозо-6-фосфата фруктокиназой (ФРК). Дальнейший же распад С6 фосфосахаров происходит по пути Энтнера – Дудорова [1].

В ходе работы получены гомогенные белковые препараты рекомбинантных МТД и ФРК. МТД катализирует обратимое окисление маннита до фруктозы с восстановлением НАД⁺ до НАДН. Фермент является мономером с молекулярной массой 53 кДа и относится к семейству длинноцепочечных дегидрогеназ. Максимальная активность МТД составила 136 Е/мг белка. Рабочий диапазон рН фермента в сторону образования фруктозы от 8 до 11 с оптимумом рН 10,5, однако в обратную сторону фермент работает в диапазоне от 6 до 9 с оптимумом рН 7,5. Температурный оптимум составил 50 °С. МТД – термостабильна, выдерживает нагрев до 50 °С без потери активности в течение 60 минут. При оптимальном рН и 30 °С значение Км для маннита составило (0,24 ± 0,027) мМ, для НАД⁺ – (0,035 ± 0,002) мМ, для фруктозы – (16,33 ± 3,01) мМ, для НАДН – (0,007 ± 0,001) мМ. Фосфоенолпируват в концентрации 1 мМ выступает в качестве умеренного ингибитора МТД, снижая её активность на 30 %. С другой стороны, сукцинат, гидроксипируват, глюкоза-1,6-бисфосфат, АДФ, фумарат, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, глюкоза-6-фосфат и АМФ увеличивали активность фермента на 30 – 50 %.

ФРК катализирует последующее фосфорилирование фруктозы до фруктозы-6-фосфата за счет энергии АТФ. Максимальная активность ФРК составила 17 Е/мг белка. Рабочий диапазон рН фермента 7–10 с оптимумом рН 9,5. Температурный оптимум составил 60 °С. ФРК – термостабильна, выдерживает нагрев до 50 °С без потери активности в течение 60 минут. Интермедиаты мета-

близма не оказывают явного влияния на работу ФРК, однако двухвалентные ионы Cu^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 1 мМ полностью ингибируют активность фермента. При оптимальном pH и 30 °C значение K_m для фруктозы составило $(0,24 \pm 0,031)$ мМ, для АТФ $(0,14 \pm 0,018)$ мМ.

Выращивание *Mb. pamukkalensis* РК2 одновременно на метаноле и манните показало, что пути утилизации обоих субстратов функционируют параллельно и с относительно схожей эффективностью, о чем свидетельствуют данные скорости и объема использования субстратов относительно показателей роста культуры. Таким образом, можно говорить о полной независимости путей окисления и ассимиляции маннита и метанола. Однако активность МДГ отсутствовала в бесклеточных экстрактах клеток, выращенных на метаноле, что указывает на индуцибельность данного пути.

С помощью гена контрелекции *sacB* был получен безмаркерный делеционный штамм по 4 генам, кодирующим белки транспортной системы маннита. Данный штамм был не способен расти на манните. Следовательно, маннит проникает в клетки *Mb. pamukkalensis* за счет строго специфичной транспортной системы ABC типа.

Список использованных источников

1. Poroshina, M.N. *Methylobrevis pamukkalensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant restricted facultative methylotroph isolated from saline water / M.N. Poroshina, Y.A. Trotsenko, N.V. Doronina // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – Vol. 65. – P. 1321–1327.

Гликозил-гидролазы бактерии *Bifidobacterium longum*

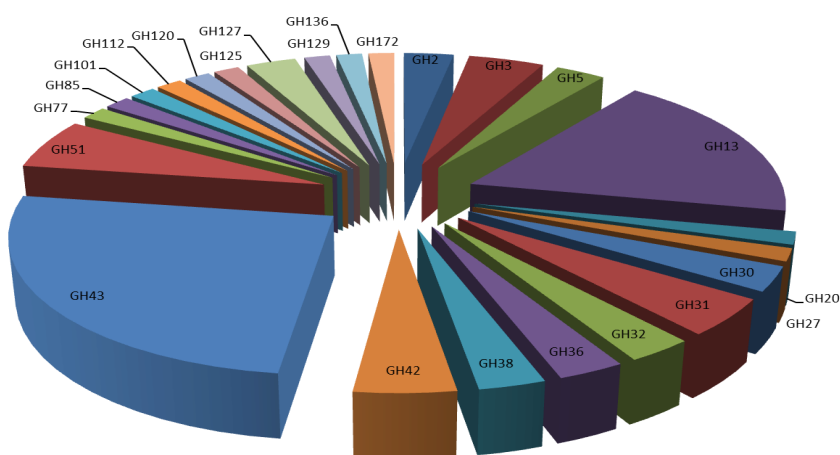
Морозова А.Н., Головнева Н.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: bifidoby@yandex.by

Бифидобактерии – грамположительные анаэробные бактерии, представители микробиоты дистальных отделов кишечника человека. У микроорганизмов рода *Bifidobacterium* эволюционно сформировалась способность ферментировать сложные углеводы и гликаны, что имеет важное значение для поддержания здоровья организма хозяина. Широкий спектр ферментов углеводного метаболизма обеспечивает бифидобактериям конкурентное преимущество в микробной экосистеме кишечника, выживаемость, способствует взаимодействию с другими членами микробиоценоза ЖКТ. Важнейшими ферментами углеводного обмена бактерий являются гликозил-гидролазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов [1]. К гликозидазам относятся α - и β -галактозидазы, α -арабинофуранозидаза, арабинозидаза, α -амилаза, α - и β -глюкозидазы, глюкозилгидролаза, гексозаминидаза, изомальтаза, инулиназа (β -фруктофуранозидаза), ксиланаза, неопулланаза, мальтаза, α -маннозидаза, и другие ферменты [2].

Цель работы – анализ спектра гликозидаз *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д.

Для классификации белков, относящихся к семействам гликозил-гидролаз (GH_s), в настоящее время разработана база данных CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) (<http://www.cazy.org/>).



Соотношение (%) семейств гликозил-гидролаз (GH) в геноме штамма *B. longum* БИМ В-813Д

Анализ аминокислотных последовательностей штамма *B. longum* БИМ В-813Д позволил выявить генетические области, кодирующие гликозил-гидролазы 25 семейств (см. рисунок). Большинство ферментов принадлежат к семействам GH43, GH13, GH42, GH51, GH3.

Самое многочисленное семейство GH43 представлено в основном β -ксилозидазами и α -арабинофуранозидами. β -Ксилозидазы гидролизуют (1 \rightarrow 4)- β -D-ксиланы, удаляя последовательные остатки D-ксилозы с невосстанавливающего конца. Семь ферментов данной группы содержат Ig-подобные фрагменты, которые часто обнаруживаются в белках клеточной поверхности и фимбриальных органеллах, имеющих важное значение для адгезии клеток хозяина и инвазии патогенных штаммов, являющихся структурными компонентами фимбриальных систем пилуса и членами семейства адгезинов внешней мембраны [3].

β -галактозидазы (лактазы) *B. longum* БИМ В-813Д относятся к семействам GH2 и GH42. Основной функцией β -галактозидаз является гидролиз β -галактозидов с отщеплением остатка β -D-галактозы. В определенных условиях эти ферменты катализируют реакцию трансгликозилирования, продуктами которой являются галактоолигосахариды. Также важно отметить наличие двух α -галактозидаз семейства GH36, которые осуществляют гидролиз α -D-галактозидной связи α -D-галактозидов, олигосахаридов, галактоманнанов и галактолипидов. К гликозидазам GH13 относятся α -амилазы, которые катализируют гидролиз крахмала, гликогена и родственных поли- и олигосахаридов.

В семействе GH51 выявлены эндоглюканаза (целлюлаза) и α -L-арабинофуранозидаза. Эндоглюканаза катализирует гидролиз (1 \rightarrow 4)- β -D-глюкозидных связей в целлюлозе, лишенине и β -D-глюканах злаков. α -L-Арабинофуранозидаза расщепляет концевые невосстанавливающие остатки α -L-арабинофуранозидов.

Семейство GH3 составляют β -глюкозидазы, основной функцией которых является гидролиз конечных, невосстанавливающихся остатков β -D-глюкозидов с выделением β -D-глюкозы.

Анализ гликозил-гидролаз, дальнейшее биохимическое исследование ферментов *B. longum* БИМ В-813Д позволят расширить потенциал использования бифидобактерий в биотехнологиях, сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности.

Список использованных источников

1. Pokusaeva, K. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria / K. Pokusaeva, G.F. Fitzgerald, D. van Sinderen // *Genes Nutr.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. 285–306.
2. Devika, N.T. Deciphering the metabolic capabilities of Bifidobacteria using genome-scale metabolic models / N.T. Devika, K. Raman // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1–9.
3. Immunoglobulin domains in Escherichia coli and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies / G. Bodelón, C. Palomino, L.Á. Fernández // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2013. – Vol. 37, № 2. – P. 204–250.

Молекулярно-генетический анализ плазмид термофильных бактерий *Sutcliffiella horikoshii* ВАТ

Муратова А.А., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: anya.muratova.93@mail.ru*

Перспективными объектами исследований в области генетики микроорганизмов являются плазмиды природных бактерий. В природных условиях плазмиды способствуют быстрой эволюции бактерий и освоению новых экологических ниш [1]. В генной инженерии плазмиды используются в качестве инструментов для направленного создания микроорганизмов с заданными свойствами.

Ранее нами были описаны термо- и алкалофильные бактерии вида *Sutcliffiella horikoshii*, которые несут в составе генома природные плазмиды [2]. По состоянию на начало 2023 года в литературных источниках отсутствуют сведения о внехромосомных генетических элементах представителей данного рода. При этом нередко именно плазмиды несут гены, позволяющие бактериям адаптироваться к экстремальным условиям. Цель исследования – молекулярно-генетический анализ плазмид термо- и алкалофильных бактерий *S. horikoshii* ВАТ.

На основе результатов полногеномного секвенирования штамма *S. horikoshii* ВАТ [3] определено, что геном данного штамма представлен кольцевой хромосомой и тремя кольцевыми плазмидами рВН-ВАТ-10, рВН-ВАТ-15, рВН-ВАТ-167 с копийностью 6, 8 и 1,5 копии относительно хромосомы соответственно. С помощью инструмента PGAP (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) показано, что в пределах плазмиды рВН-ВАТ-10 (содержание ГЦ-пар 37 %, размер 10 158 п. н.) локализовано 17 белок-кодирующих последовательностей (БКП), включая гены *rep* и *mob*, определяющие репликацию и мобилизацию соответственно; ген, кодирующий белок семейства VanZ; ген *ujcZ*, продукт которого вовлечён в процесс споруляции; гены *fbpA* и *fbpB*, функция продуктов которых заключается в регуляции гомеостаза железа у бактерий; ген, кодирующий FliL-подобный белок; ген, кодирующий белок с доменом «спираль – поворот – спираль». Также в рВНВАТ-10 локализованы гены с неопределённой функцией в пределах которых отсутствуют известные консервативные домены.

Плазмида рВН-ВАТ-15 (содержание ГЦ-пар 38 %, размер 15 215 п. н.) несёт в своем составе 19 БКП: ген транскрипционного регулятора семейства ArpU; ген *ftsK* (продукт участвует в клеточном делении); гены с вероятной регуляторной функцией, кодирующие белки с доменом «спираль – поворот – спи-

раль; ген, кодирующий токсин системы токсин-антитоксин типа II (семейство PemK/MazF), который играет роль в постсегрегационной гибели дочерних клеток, утративших плазмиду, а также в образовании биоплёнок, формировании антибиотикорезистентности и вирулентности [4], и несколько белок-кодирующих последовательностей с неизвестной функцией.

В составе мегаплазмиды pВН-ВАТ-167 (содержание ГЦ-пар 35 %, размер 167 860 п. н.) были предсказаны 173 БКП, определяющие синтез широкого круга соединений и ферментов (рекомбиназ, металлогидролаз, оксидоредуктаз, топоизомераз, лигаз, полимераз, белков системы секреции IV типа, белков системы рестрикции-модификации I типа и др.). С использованием интернет-ресурса antiSMASH v. 7.0 установлено, что в пределах pВН-ВАТ-167 локализован кластер генов (координаты области K7887_22730–K7887_22820), предположительно определяющий синтез вторичного метаболита типа лантибиотиков – небольших пептидов с высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий [5].

Таким образом, плазмиды pВН-ВАТ-10, pВН-ВАТ-15 и pВН-ВАТ-167 бактерий *S. horikoshii* ВАТ несут в своем составе генетические детерминанты, кодирующие ряд белков с практически значимыми функциями, которые в том числе могут участвовать в адаптации к экстремальным условиям. Кроме того, данные плазмиды потенциально могут быть использованы для создания векторных систем для грамположительных микроорганизмов.

Список использованных источников

1. Shintani, M. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy / M. Shintani, Z.K. Sanchez, K. Kimbara // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6.
2. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species / R.S. Gupta [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – Vol. 70, № 11. – P. 5753–5798.
3. Муратова, А.А. Анализ генома термофильных бактерий *Sutcliffiella horikoshii* ВАТ / А.А. Муратова, Е.В. Охремчук // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы V Междунар. науч. конф., посвящ. 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. – Минск, 2022. – С. 170.
4. Бактериальные токсин-антитоксиновые системы и новые стратегии создания антибактериальных препаратов / А.Б. Георгиевич [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – Т. 63, № 3–4. – С. 50–58.
5. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin / C. Klein [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58, № 1. – P. 132–142.

Секвенирование и сборка генома бактерии *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8, возбудителя угловатой пятнистости листьев огурца

Муратова А.А., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: anya.muratova.93@mail.ru*

Род гамма-протеобактерий *Pseudomonas* включает как патогенные, так и стимулирующие рост растений виды, которые встречаются повсеместно. Псевдомонады являются важным объектом современных микробиологических исследований за счет того, что обладают широким кругом различных активностей [1]. Вид *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* относится к группе фитопатогенных бактерий, которые вызывают угловатую пятнистость листьев огурца [2]. В 2006 г. на территории Республики Беларусь доцентом В.Е. Мямным был выделен штамм *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8. Проведение молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности изучаемого штамма может прояснить путь распространения данного патогена. Таким образом, целью настоящего исследования являлось секвенирование и сборка генома фитопатогенного штамма *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8, выделенного на территории Республики Беларусь.

Для выделения геномной ДНК из штамма *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8 (номер в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов – БИМ В695) использовали набор Bacteria DNA Preparation – Solution Kit (Jena Bioscience, PP-206). Секвенирование проводили на платформах MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore Technologies). Для приготовления библиотек ДНК использовался набор реактивов «Nextera XT DNA Library Prep Kit» (Illumina, FC-131-1024) для последующего секвенирования по методу Illumina, или набор «Ligation Sequencing Kit» (Oxford Nanopore Technologies, SQK-LSK109) для секвенирования с помощью нанопор. Для последующей сборки полногеномной последовательности применяли ряд программ (Trimmomatic-0.39, Barapost v. 2020-09-03, SPAdes v. 3.13.1, Flye v. 2.8, Bowtie2 v. 2.4.2, Tablet v1.19.09.03, Pilon v. 1.23). Аннотацию нуклеотидных последовательностей проводили с помощью конвейера аннотации прокариотических геномов Национального центра биотехнологической информации США (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline NCBI, USA).

В результате проведённой работы данные, полученные с помощью секвенатора MinION, собраны в черновик генома, которые с помощью высококачественных прочтений, полученных на приборе MiSeq, преобразованы в итоговую последовательность генома штамма *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8, пригодную

для дальнейшего анализа. Геномная последовательность изучаемых бактерий депонирована в GenBank, номера для доступа: CP075 686–CP075 690. Геном *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8 представлен кольцевой хромосомой и четырьмя кольцевыми плазмидами: pPAL8-01 (77 748 п. н., содержание ГЦ-пар 56 %), pPAL8-02 (72 398 п. н., содержание ГЦ-пар 55 %), pPAL8-03 (49 000 п. н., содержание ГЦ-пар 54 %) и pPAL8-04 (9 600 п. н., содержание ГЦ-пар 55 %). Общие характеристики нуклеотидной последовательности генома изучаемых бактерий представлены в таблице.

Общие характеристики генома *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8

Параметр	Показатель
Размер, п. н.	6 054 652
Содержание ГЦ-пар, %	58,11
Общее количество генов	5757
Количество генов, кодирующих белки	5487
Гены РНК кластеров:	85
pРНК (5S, 16S, 23S)	6, 5, 5
тРНК	65
Другие некодирующие РНК	4
Псевдогены	185

В дальнейшей работе планируется проведение молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности генома фитопатогенной бактерии *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8 для выявления основных генов, определяющих биологические свойства и стабильность исследуемого штамма.

Список использованных источников

1. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas* / M. Gomila [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – Т. 6.
2. Olczak-Woltman, H. Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* / H. Olczak-Woltman, M. Schollenberger, K. Niemirowicz-Szczytt // J. Appl. Genet. – 2009. – Vol. 50, № 1. – P. 1–7.

Влияние стрессовых факторов на продукцию вторичных метаболитов у бактерий рода *Rhodococcus*: физиологический и геномный аспекты

Нечаева И.А., Суворова В.В., Парфенова А.С., Филиппова А.С.

Тульский государственный университет, Естественнонаучный институт, кафедра «Биотехнологии», НИЦ «БиоХимТех», Тула, Россия, электронный адрес: nechaeva1902@gmail.com

При росте в естественной среде бактерии подвергаются широкому спектру разнообразных стрессовых факторов, таких как изменение температур, действие химических соединений, дефицит питательных веществ, экстремальные значения рН, токсичное воздействие металлов, высушивание, высокие концентрации органических растворителей [1]. Одним из механизмов защиты является образование бактериальными клетками соединений, обеспечивающих снижение влияния стрессового фактора, например, ретинола, аскорбиновой кислоты, α -токоферола, каротиноидов, углеводов, глицин-бетаина, полимеров декстрана, полиэтиленгликоля, эктоина, фенольных соединений, пролина, триацилглицеридов (ТАГ), восковых эфиров (ВЭ), полигидроксиалканоатов (ПГА), увеличение доли насыщенных короткоцепочечных жирных кислот с разветвленной цепью [2]. Важность изучения механизмов действия и защиты от различных стрессовых факторов обусловлена их прямой связью с современными биотехнологиями, например, биоремедиацией почв, биосорбцией металлов, промышленным синтезом практически значимых соединений.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* – идеальные кандидаты для применения в микробной биотехнологии за счет их метаболической универсальности, способности продуцировать соединения, имеющие практическое значение, и устойчивости к стрессовым условиям окружающей среды.

Для штамма-деструктора углеводов нефти *Rhodococcus erythropolis* X5, входящего в состав биопрепарата «МикроБак» [3], показано изменение жирнокислотного состава общих липидов клеток под влиянием температурного стресса (пониженной температуры культивирования) и внутриклеточное накопление ТАГ. В результате действия окислительного стресса (использование в качестве единственного источника углерода и энергии углеводов нефти и присутствие в ростовой среде перекиси водорода) данный штамм накапливает каротиноиды и эктоин.

В настоящее время для детального изучения практически важных микроорганизмов широко используется полногеномное секвенирование [4]. Данная технология позволяет оценить генетический потенциал продуцента, научно обосновать его биологическую безопасность, создать генетический паспорт

для коммерческого использования, а также заложить основу для изучения молекулярно-генетических механизмов, определяющих функциональную активность [5].

Геном штамма *Rh. erythropolis* X5 представлен хромосомой и кольцевой плазмидой – pRhX5 [6]. При анализе хромосомных генов были выявлены кластеры генов, ответственные за продукцию вторичных метаболитов: сидерофоров – гетеробактина и эритрохелина, эктоина, каротиноидов, жирных кислот с разветвленной углеводородной цепью, антибиотиков. При поиске генов, входящих в кластеры биосинтеза каротиноидов, было обнаружено, что для *Rh. erythropolis* X5 характерно наличие генов, ответственных за синтез кетопроизводных γ -каротина. На хромосоме были найдены 5 генов синтеза эктоина, три из которых образуют оперон синтеза эктоина и 15 генов, относящихся к разным путям биосинтеза трегалозы. После обнаружения генов, кодирующих ферменты биodeградации алканов до жирных кислот и синтеза ТАГ, была составлена карта предположительного метаболического пути синтеза ТАГ в клетках данного штамма. На плазмиде pRhX5 обнаружены гены, обеспечивающие устойчивость штамма к действию таких тяжелых металлов как мышьяк, ртуть, кадмий и медь, гены цитохрома P450 и гены универсального стрессового белка.

Таким образом, изучение адаптационных механизмов бактерий к стрессовым факторам окружающей среды и поиск генов биосинтеза различных протекторных соединений позволит проводить исследования по увеличению продукции практически ценных вторичных метаболитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Список использованных источников

1. Pátek, M. Stress response in Rhodococcus strains / M. Pátek, M. Grulich, J. Nešvera // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 53. – P. 107698.
2. *Biotechnology of Rhodococcus for the production of valuable compounds* / M. Cappelletti [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 104. – P. 8567–8594.
3. Филонов А.Е., Шкидченко А.Н., Воронин А.М. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения : пат. на изобретение РФ № 2378060,05.07.2007 / А.Е. Филонов, А.Н. Шкидченко, А.М. Воронин.
4. Биоинформатический анализ генома производственного штамма *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4 / А. Г. Точилина [и др.] // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2019. – Т. 37, № 3. – С. 128–133.
5. Анализ генома бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-439Д / М. А. Титок [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 592–600.
6. Analysis of genome sequence and trehalose lipid production peculiarities of the thermotolerant *Gordonia* strain / Y. Deegan [et al.] // *Journal of basic microbiology*. – 2020. – Т. 60, № 1. – P. 14–21.

Транскрипционная регуляция в патосистемах с участием *Pectobacterium* spp.

Николайчик Е.А., Вычик П.В., Колубако А.В., Дюбо Ю.В., Шарангович М.С., Игнатенко Е.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: nikolaichik@bio.bsu.by

Пектобактерии традиционно рассматривались как патогены широкого круга хозяев, полагающиеся главным образом на массовую продукцию гидролитических экзоферментов и поэтому не требующие сложной связи с растением. Однако с развитием «омных» исследований становится все более очевидным, что *Pectobacterium* spp. являются довольно специализированными патогенами с тонкой адаптацией к узкому кругу растений-хозяев, а «широкий круг хозяев» пектобактерий во многом объясняется несовершенством их ранней классификации. Современная классификация с опорой на почти 500 секвенированных геномов включает уже 21 вид пектобактерий с более точно очерченным кругом хозяев и позволяет лучше понять механизмы их взаимодействия с растениями.

Несколько массивов транскриптомных данных, доступных для пектобактерий, специализированное программное обеспечение для анализа регуляции транскрипции (github.com/nikolaichik/SigmoID) позволили нам провести полногеномный анализ регуляции транскрипции избранных видов пектобактерий с последующей экспериментальной верификацией ключевых закономерностей. Основные выводы этого анализа, вероятно, справедливы и для большинства других таксономических групп бактериальных фитопатогенов:

набор генов, кодирующих основные факторы вирулентности, весьма сходен у разных видов и штаммов, но регуляторные области и, следовательно, паттерны экспрессии многих генов радикально различаются;

до половины всех генов могут не экспрессироваться или иметь очень низкий уровень экспрессии в определенных условиях, при этом некоторые слабо экспрессируемые гены являются ключевыми факторами вирулентности;

pectobacterium spp. имеют до 350 факторов транскрипции, около четверти из которых в большинстве геномных последовательностей не аннотированы как таковые;

глобальные регуляторы транскрипции более консервативны, но их регулоны более вариабельны. Противоположное верно для локальных регуляторов;

процент генов, дифференциально экспрессируемых в растении, среди факторов транскрипции выше (до 50 %), чем в других функциональных категориях;

наборы дифференциально экспрессируемых генов (как патогена, так и хозяина), могут мало перекрываться для родственных патосистем;

многие факторы транскрипции (и, следовательно, их регулоны) радикально меняют уровень своей экспрессии по мере прогрессии заболевания;

миниатюрные мобильные элементы (MITE) располагаются преимущественно внутри межгенных регуляторных регионов, очевидно, влияют на регуляцию, но почти никогда не аннотируются и поэтому не рассматриваются;

плазмиды присутствуют не у всех штаммов и незаслуженно игнорируются в контексте исследований взаимодействия пектобактерий с растением. рРА21А из *P. atrosepticum* кодирует эффектор и полноценную систему его секреции, причем регуляция синтеза и транспорта эффектора интегрирована со стрессовым ответом бактериальной клетки.

Перечисленные выше факторы определяют принципиально иной характер экспрессии генов родственных штаммов при заражении ими родственных растений. Поэтому к переносу выводов, сделанных для одной патосистемы на родственную, следует подходить с большой осторожностью. Полногеномный анализ регуляции транскрипции *in silico* облегчает понимание процессов, происходящих при формировании патосистем и может быть серьезным подспорьем в их экспериментальном изучении.

Помпы множественной лекарственной устойчивости и их роль в образовании биопленок на примере хлорамфеникола

Носков С.А.¹, Абдул Бари^{1,2}, Каракозова М.В.³, Назаров П.А.¹

¹*Институт физико-химической биологии им. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, электронный адрес: sergey.noskov.2001@mail.ru*

²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

³*Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

Устойчивость к антибиотикам – глобальная проблема современной медицины. Помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), участвующие в формировании резистентности к ксенобиотикам, выведении токсинов, поддержании клеточного гомеостаза и формировании биопленок и устойчивых клеток, являются краеугольным камнем защиты бактерий от антибиотиков. МЛУ-помпы являются основой для неспецифической защиты бактерий. Таким образом, неспецифическая защита бактерий формируется за счет насосов МЛУ – это барьер, препятствующий проникновению антибактериальных веществ в клетку, который является основным фактором, определяющим резистентность бактерий [1]. В этой работе мы исследуем роль МЛУ-насосов в защите бактерий от бактериостатических антибиотиков на примере хлорамфеникола. Известно, что в сублетальных концентрациях хлорамфеникол вызывает образование биопленки, которая может защищать бактерии от действия антибиотиков [2]. Мы проанализировали влияние хлорамфеникола на различные делеционные мутанты по МЛУ-помпам и обнаружили роль помп в образовании биопленок, а также в защите от антибиотика.

Мы сравнили антимикробное действие хлорамфеникола в отношении грам-отрицательных бактерий *E. coli*, используя стандартные анализы с 2-кратным разведением LB-среды в идентичных условиях. Мы использовали различные сублетальные концентрации и время инкубации с хлорамфениколом, чтобы определить, какие насосы влияют на образование биопленки. Чтобы выяснить, как соединения влияют на образование биопленки, мы оценили влияние вещества на образование биопленки как изменение соотношения планктонных и сидячих форм бактерий с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым [2]. Чтобы определить количество выживших клеток в биопленке, мы определили CFU для каждого мутанта, который отличался от дикого типа по активности.

Наше предположение о том, что бактерии образуют биопленку в качестве защиты от хлорамфеникола, полностью подтвердилось. Первоначально плава-

ющая форма бактерий эволюционировала в полностью сидячую форму биопленки. Более того, в виде биопленки наблюдался медленный рост бактерий, что подтвердило наше предположение о выживании бактерий за счет роста бактериальной популяции в составе биопленки.

При добавлении производного хлорамфеникола с берберинем (SAM-C8-Ver [2]) такого эффекта выживаемости не наблюдалось, поскольку это производное не увеличивало образование биопленки. Более того, оказалось, что насосы, которые, казалось, были задействованы в откачке хлорамфеникола из клетки, на самом деле не участвуют в его откачке, но, по-видимому, принимают участие либо в образовании биопленки, либо изменяют стехиометрию насосов, участвующих в откачке хлорамфеникола.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант 22-15-00 099).

Список использованных источников

1. Nazarov, P.A. MDR Pumps as crossroads of resistance: Antibiotics and Bacteriophages / P.A. Nazarov // *Antibiotics*. – 2022. – Vol. 11, № 6. – P. 734.
2. Conjugates of Chloramphenicol Amine and Berberine as Antimicrobial Agents / J.A. Pavlova [et al.] // *Antibiotics*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 15.

Реидентификация коллекционных штаммов *Rhodococcus erythropolis* с помощью ПЦР-анализа и многолокусного секвенирования

Орловская П. И., Барейко А. А., Леонович С. И., Сидоренко А. В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: orlovskapi@gmail.com

Бактерии рода *Rhodococcus* составляют значительную часть фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и представляют интерес для использования в биотехнологии. Таксономическая принадлежность большинства коллекционных культур родококков определена на основании изучения их морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков. Однако корректная идентификация бактерий рода *Rhodococcus* по фенотипическим признакам крайне затруднительна из-за их гетерогенности и сходства с представителями других родов класса *Actinobacteria*. В настоящее время для видовой идентификации бактерий широкое распространение получил анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Кроме того, в качестве генетических маркеров используются высококонсервативные гены, кодирующие ключевые ферменты бактериальной клетки (гиразы, полимеразы, рекомбиназы и др.) или гены, характерные для определенных групп бактерий (например, кодирующие ферменты катаболизма углеводов) [1].

Данная работа посвящена уточнению таксономической принадлежности коллекционных штаммов *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus* sp. с помощью ПЦР-анализа и многолокусного секвенирования.

Объектами исследования служили 39 штаммов *R. erythropolis* и 10 штаммов *Rhodococcus* sp. из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. В качестве генетических маркеров для идентификации данных бактерий были выбраны гены 16S рРНК, *alkB3* (кодирует алкан-1-монооксигеназу) [2] и *lpldh* (кодирует L-пантоил лактон дегидрогеназу) [3]. ПЦР-анализ проводили, используя две пары видоспецифичных праймеров, амплифицирующих фрагменты генов *alkB3* (*alkB3*-f, 5'-ACGAAGCGATCCCTGAATTGC-3' и *alkB3*-r, 5'-GTAGCAAGCCGTAGTGCTCG-3') и *lpldh* (LPLDH-pK4F, 5'-TGCCACTGACACTGATGATGCGTCCG-3' и LPLDH-pK4R, 5'-GTCTCGTGCGGACCGAAAACAACCCT-3') [2, 3].

По результатам ПЦР-анализа с видоспецифичными праймерами *alkB3*-f / *alkB3*-r и LPLDH-pK4F / LPLDH-pK4R подтверждена видовая принадлежность 16 коллекционных штаммов (41 % от общего количества), депонированных как *R. erythropolis*, кроме того, к данному виду отнесено 3 штамма, депонированных как *Rhodococcus* sp. Следует отметить, что праймеры

alkB3-f / alkB3-r характеризовались более высокой специфичностью по сравнению с праймерами LPLDH-pK4F / LPLDH-pK4R, поскольку при использовании последних для 2 штаммов *R. erythropolis* (5,1 % от общего количества) образования ампликонов целевого размера не наблюдалось.

Проведено многолокусное секвенирование 10 штаммов *R. erythropolis* для подтверждения их таксономического статуса и выявления генетической гетерогенности. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, *alkB3* и *lpldh* исследуемых штаммов родококков с последовательностями референсных штаммов из базы данных ГенБанк показал, что они имеют максимальное сходство с представителями вида *R. erythropolis*. При этом уровень сходства нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК варьировал в пределах 96,5–100 % (т.е. для некоторых исследуемых штаммов был ниже порогового уровня 98,7 %), а сходство последовательностей генов *alkB3* и *lpldh* составляло 98,26–99,96 %.

Филогенетический анализ секвенированных последовательностей генов 16S рРНК, *alkB3* и *lpldh* подтвердил, что исследуемые штаммы родококков наиболее близки с представителями вида *R. erythropolis*, хотя топология филогенетических деревьев, построенных по разным генам, отличалась.

Список использованных источников

1. Glazunova, O. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus* / O. Glazunova, D. Raoult, V. Roux // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 2317–2322.
2. Ratnikova, M.S. Molecular genetic markers for identification of *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus qingshengii* / M. S. Ratnikova, M. A. Titok // Microbiology. – 2020. – Vol. 89, № 4. – P. 444–452.
3. L-pantoyl lactone dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis*: genetic analyses and application to the stereospecific oxidation of L-pantoyl lactone / D. Si [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 95, № 2. – P. 431–440.

Метатаксономический анализ керна из озера Нижнее, Земля Эндерби, Восточная Антарктида

Охремчук Е.В.¹, Охремчук А.Э.¹, Валентович Л.Н.¹, Корзун Е.В.², Мямин В.Е.²,
Гигиняк Ю.Г.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

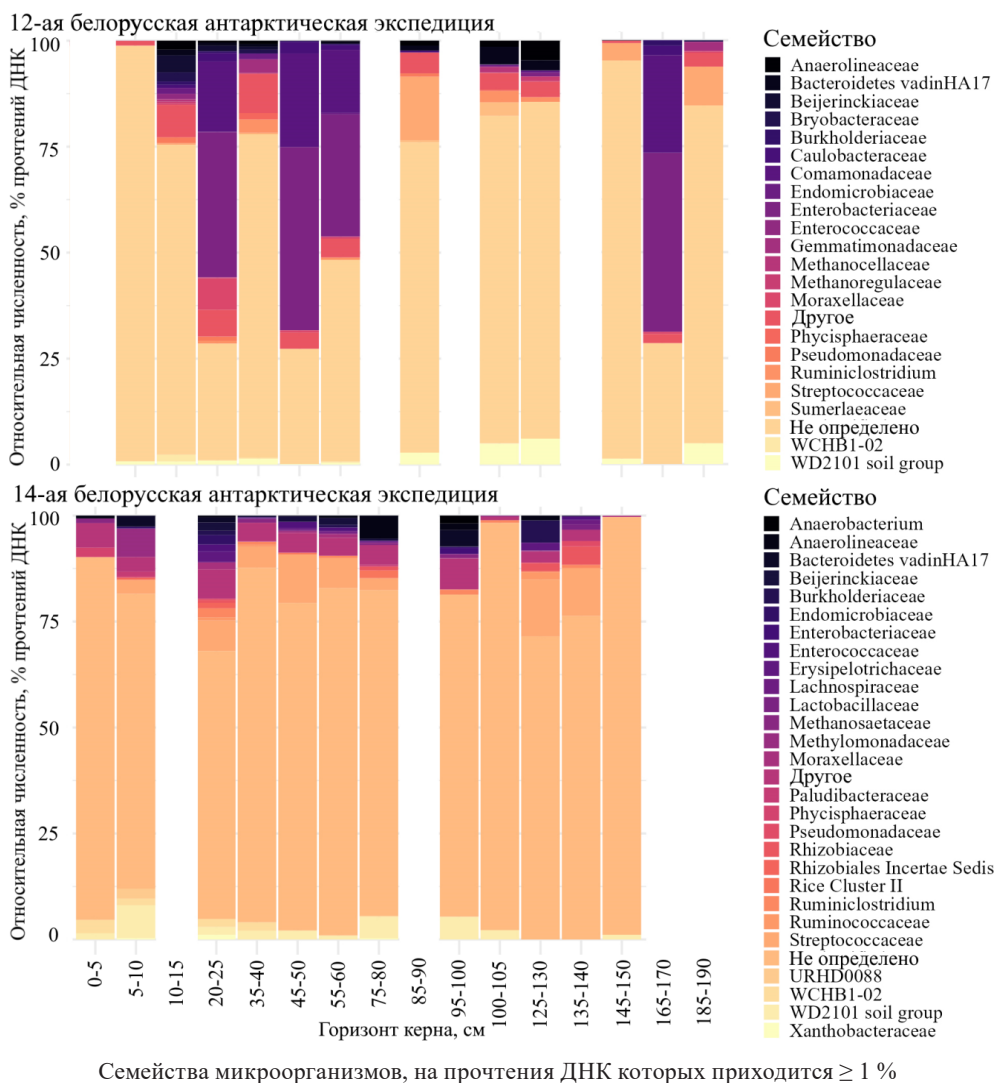
²ГНПО «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по биоресурсам», Минск, Беларусь,
электронный адрес: katerina_akhr@bio.bsu.by

Изменение климата и природной среды на Земле происходит под влиянием как абиогенных, так и биогенных факторов. С данной точки зрения для описания геологического прошлого и природно-климатического развития Земли интерес представляет изучение Антарктических регионов, где антропогенное влияние значительно ниже, чем в других областях. В рамках 12-й и 14-й Белорусских антарктических экспедиций были получены образцы керна со дна озера Нижнее (70°33'00" ю. ш. 67°56'00" в. д.) с полным вертикальным разрезом бактериальных матов и донных отложений. Возраст нижних горизонтов керна может достигать 14–20 тыс. лет (неопубликованные данные радиоизотопного анализа). И на каждом горизонте возможно сохранение палеомикробиоты, а также формирование уникальных микробсообществ.

Изучение микробных сообществ проводили путем выделения метагеномной ДНК из различных горизонтов керна с последующим секвенированием на платформе Illumina MiSeq библиотек V3-V4 переменных регионов генов 16S рРНК, подготовленных на матрицах метагеномной ДНК.

Среди горизонтов керна наиболее распространены были нуклеиновые кислоты представителей отделов *Firmicutes*, *Halobacterota*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Planctomycetota*, *Proteobacteria* и *Caldisericota* (встречались в ≥ 50 % образцов). Примечательно, что все горизонты керна содержали большое число нуклеотидных последовательностей, которым не удалось присвоить таксономическое положение, что может свидетельствовать о присутствии мало изученных групп микроорганизмов в керне (см. рисунок). По фрагментам генов 16S рРНК также удалось классифицировать часть представителей архей, присутствовавших в образце. Представители метаногенов из отделов *Halobacterota* (археи семейств *Methanosaetaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanocellaceae* и др.) и симбиотических архей отдела *Nanoarchaeota* обнаруживались в большинстве изученных горизонтов. На глубине 10–25 см присутствовала ДНК представителей отдела *Thermoplasmata* из семейства *Methanomassiliicoccaceae* – метаногенов, ацидофилов, филогенетически далеких от других метаногенных микроорганизмов, встречающихся как в пищеварительном тракте животных,

так и в водных и наземных биотопах [1, 2]. В горизонтах, лежащих ниже 35 см, обнаружена ДНК архей отделов *Crenarchaeota*, часто обнаруживаемых в анаэробных отложениях [3], и *Iainarchaeota* (представители супергруппы архей, характеризующейся нанометровыми размерами клеток и небольшими геномами) [4].



Таким образом, микробные сообщества, характерные для антарктических регионов, являются уникальными и включают мало изученные либо неопи- санные группы микроорганизмов, часть из которых являются некультивиру- емыми. Для более детального описания данных бактерий требуется изучение

геномов микроорганизмов, что позволит описать метаболический потенциал и предположить, в каких климатических и физико-химических условиях обитали данные организмы.

Список использованных источников

1. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine / G. Borrel [et al.] // *BMC Genomics* – 2014. – Vol. 15. – P. e679.
2. New insight into the ecology and Physiology of Mrthanomassiliicoccales from Terrestrial and Aquatic Environments / M. Cozannet [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – P. e30.
3. Comparative genomics reveals thermal adaptation and a high metabolic diversity in “Candidatus Bathyarchaeia” / Y.-L. Qi [et al.] // *mSystems*. – 2021. – Vol. 6. – P. e00252-21.
4. Genomic expansion of domain Archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling / C. J. Castle [et al.] // *Current Biology*. – 2015. – Vol. 25, № 6. – P. 690–701.

Конструирование и характеристика делеционного мутанта *Erwinia amylovora* по гену транскрипционного регулятора *mprA*

Песочкая К.Ю.¹, Лагоненко А.Л.², Евтушенков А.Н.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: lagonenkoal@mail.ru

²ООО «Альгимед Техно», Минск, Беларусь

Фитопатогенные бактерии встречаются среди представителей родов *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Dickeya*, *Pectobacterium* и др. Эти бактерии являются возбудителями большого количества бактериозов растений, таких как вилты (увядания), бактериальный рак растений, мягкие гнили, некрозы и др. [1, 2]. Одним из наиболее вредоносных заболеваний растений является бактериальный ожог плодовых, вызываемый грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora*. В настоящее время известно, что *E. amylovora* продуцирует большое количество факторов вирулентности: экзополисахариды амиловоран и леван, систему секреции III типа, сидерофоры. Также к факторам вирулентности *E. amylovora* традиционно относят подвижность клеток и их способность образовывать биопленки [3].

В формировании устойчивости *E. amylovora* к негативным воздействиям (в том числе, к антибиотикам) участвуют эффлюксные насосы (efflux pump) – системы выведения (эффлюкса) токсичных соединений из клетки. Некоторые из таких систем обладают чрезвычайно широкой специфичностью, охватывающей практически все антибиотики, химиотерапевтические агенты, моющие средства, красители и др., некоторые, в свою очередь, активны в отношении одного вещества или класса веществ [4]. У ряда грамотрицательных бактерий белок MprA (EmrR) выполняет роль регулятора транскрипции эффлюксного насоса множественной устойчивости к антибиотикам разного действия (Multidrug Resistance, MDR) [5, 6, 7]. У бактерий *E. amylovora* функциональная роль белка MprA, принадлежащего к семейству транскрипционных регуляторов MarR, остается невыясненной.

В ходе анализа генома *E. amylovora* E2 было выявлено четыре гена, кодирующие регуляторы MarR-семейства: *mprA* (координаты в геноме 2834616..2835146 п. н.), *marR* (1533551..1533982 п. н.), *ohrR* (3717873..3718340 п. н.) и *slyA* (1802653..1803090 п. н.).

Для инактивации гена *mprA* были сконструированы праймеры для амплификации гена устойчивости к канамицину в составе плазмиды pKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 н.) соответствующие началу или концу делелируемой области генома *E. amylovora*. Полученные с помощью таких праймеров ПЦР-продукты были трансформированы в клетки *E. amylovora* E2,

несущие хелперную плазмиду pKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы. В результате проделанной работы был отобран штамм, устойчивый к канамицину. Наличие мутации было подтверждено ПЦР с праймерами к областям, фланкирующим делецию, а также с внутренними праймерами к гену устойчивости к канамицину.

Далее нами была осуществлена фенотипическая характеристика полученного мутанта. В результате было выявлено, что делеция гена *mprA* вызвала увеличение образования биопленок на полноценной среде LB и увеличение продукции экзополисахарида амиловорана, составляющего матрикс биопленок. Показано также, что штамм *E. amylovora* $\Delta mprA$ обладал сниженной подвижностью на минимальной среде M9, характеризовался повышенной устойчивостью к налидиксовой кислоте (в концентрациях 0,1 и 0,5 ммоль/л) и снижением устойчивости к пероксиду водорода (в концентрациях 5,5 моль/л; 6,0 моль/л; 6,5 моль/л).

Список использованных источников

1. Горшков, В.Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем / В.Ю. Горшков. – Казань : Изд-во Сергея Бузукина, 2017. – 304 с.
2. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield [et al.] // *Molecular Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 614–629.
3. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China / Y. Zhao [et al.] // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2019. – Vol. 18, № 4. – P. 815–820.
4. Alav, I. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation / I. Alav, J.M. Sutton, K.M. Rahman // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 73, № 8. – P. 2003–2020.
5. Lomovskaya, O. EmrR Is a Negative Regulator of the *Escherichia coli* Multidrug Resistance Pump EmrAB / O. Lomovskaya, K. Lewis, A. Matin // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – Vol. 177, № 9. – P. 2328–2334.
6. A Dopamine-Responsive Signal Transduction Controls Transcription of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence Genes / D. Yang [et al.] // *Molecular Biology and Physiology*. – 2019. – Vol. 10, № 2. – P. 1–19.
7. EmrR-Dependent Upregulation of the Efflux Pump EmrCAB Contributes to Antibiotic Resistance in *Chromobacterium violaceum* / K.C.M. Barroso [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1–12.

Влияние Nε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli*

Плеханова Н.С., Шитенкова Е.В., Липкин А.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия,
электронный адрес: plekhanovans@mail.ru

Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФД) – один из ключевых ферментов центрального метаболизма клетки. Ранее сообщалось об успешном создании мутантных форм фермента с двойной кофакторной специфичностью ГАФД *E. coli* [1]. Среди всех исследованных мутантных ГАФД, наибольшее сродство к кофакторам НАДФ⁺/НАД⁺ демонстрируют ферменты с аминокислотными заменами на лизин в позициях 34 или 189, которые расположены вблизи активного центра. Одна из возможных причин – создание потенциальных сайтов ацетилирования, которые могут влиять на удельную активность фермента.

Для проверки данной гипотезы мы сравнивали НАД⁺/НАДФ⁺-зависимую активность ГАФД после *in vitro* ацетилирования и последующего *in vitro* деацетилирования, с исходной активностью фермента. Для реакции ацетилирования использовали очищенный белковый препарат единственной охарактеризованной на данный момент ацетилтрансферазы *E. coli* YfiQ, а для реакции деацетилирования – препарат неспецифичной к механизму ацетилирования деацетилазы SobB. Влияние ацетилирования и деацетилирования анализировали для нативной и мутантных форм фермента ГАФД.

Результаты измерений энзиматической активности приведены в таблицах 1 и 2.

Ацетилирование ГАФД дикого типа приводит к двукратному увеличению удельной активности белка и ее возвращению на прежний уровень после *in vitro* деацетилирования. Мутантные ферменты демонстрировали различные свойства как в отношении к НАД⁺ в качестве ко-фактора, так и в отношении к НАДФ⁺.

Таблица 1. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*

Плаزمида	НАД ⁺ специфическая активность ГАФДГ, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
pKK-gapAwt	520,7 ± 0,75	912,4 ± 0,57	637,1 ± 0,66
pKK-gapA ^{D34K}	20 ± 0,65	13,7 ± 0,54	26,4 ± 1,2
pKK-gapA ^{D34AG188TP189K}	139 ± 0,80	224 ± 0,40	121 ± 0,60

Таблица 2. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ubhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*

Плаزمида	НАДФ ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
pKK-gapAwt	<0,01	<0,01	<0,01
pKK-gapAD34K	9 ± 0,45	18,2 ± 0,40	8,3 ± 0,25
pKK-gapAD34AG188TP189K	58,9 ± 0,36	56 ± 0,32	87,5 ± 0,44

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что процессы ацетилирования/деацетилирования лизина являются регуляторными механизмами активности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *E. coli*.

Список использованных источников

1. Engineering of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase with Dual NAD⁺/NADP⁺ Cofactor Specificity for Improving Amino Acid Production / E.A. Slivinskaya [et al.] // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, № 5. – P. 976.

Конструирование штамма *Pseudomonas putida* AK5, содержащего мутации в регуляторной области генов катаболизма салицилата

Позднякова-Филатова И.Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия, электронный адрес: irafilatova24@gmail.com

Гены катаболизма салицилата в *Pseudomonas putida* AK5 организованы в оперон (salicylate–gentisate pathway, *sgp*-оперон) и локализованы на плазмиде pAK5. Upstream *sgp*-оперона расположен дивергентно транскрибируемый ген *sgpR*, кодирующий транскрипционный регулятор LysR-семейства (LysR-type transcriptional regulators, LTTR). Строение регуляторной области *sgp*-оперона довольно типично для системы, регулируемой LTTR: сайт связывания SgpR совпадает с промотором гена *sgpR*, а -35 элемент промоторов гена *sgpR* и *sgp*-оперона перекрываются (рис. 1).

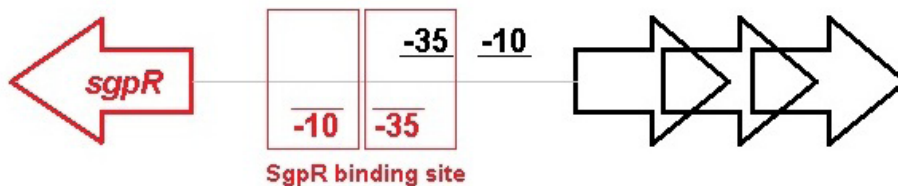


Рис. 1. Схематическое изображение регуляторной области *sgp*-оперона. Линии и надписи черного цвета – все, что относится к *sgp*-оперону (-10 и -35 элементы промотора, структурные гены), линии и надписи красного цвета – все, что относится к регулятору (регуляторный ген, -10 и -35 элементы промотора, сайта связывания SgpR). Промотор регуляторного гена сильнее промотора *sgp*-оперона, поэтому в отсутствии белка SgpR транскрипция идет именно с него; при появлении регулятора SgpR происходит авторепрессия; при появлении индуктора, салицилата, происходят конформационные изменения, при которых высвобождается -35 элемент *sgp*-оперона, что делает возможным протекание транскрипции с этого промотора

Предполагается, что LTTR в отсутствии индуктора закрывают -35 элемент промотора, а в присутствии индуктора сдвигаются с -35 элемента в сторону, делая его доступным для распознавания РНК-полимеразой. Ранее нами были получены данные, указывающие на то, что регулятор SgpR не столько физически закрывает -35 элемент промотора *sgp*-оперона, сколько изгибает этот участок, делая неоптимальным расстояние между -10 и -35 элементами промотора, что, в свою очередь, делает невозможным протекание процесса транскрипции с промотора *sgp*-оперона. Мы предположили, что в отсутствии

транскрипционного регулятора SgpR и конкурирующего промотора регуляторного гена будет наблюдаться базальная экспрессия генов *sgp*-оперона, для чего были сконструированы штаммы *Pseudomonas putida* AK5, содержащие мутации в регуляторной области *sgp*-оперона (рисунок 2).

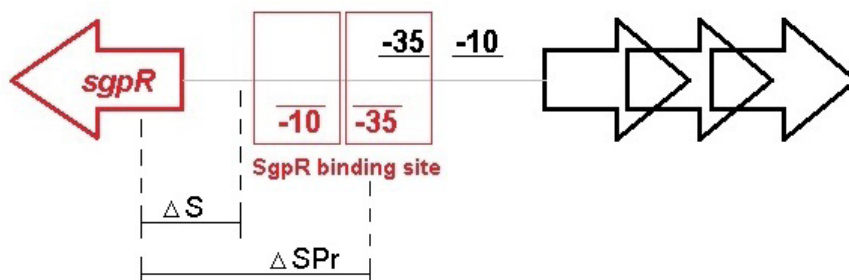


Рис. 2. Схематическое изображение необходимых делеций в регуляторной области *sgp*-оперона

Для получения необходимых мутаций были сконструированы плазмиды pJQ200KS_nS и pJQ200KS_nSPr, содержащие участки upstream и downstream удаляемого фрагмента. Рекомбинантные плазмиды были собраны с помощью метода T5 exonuclease DNA assembly (TEDA). Сконструированными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* S17-1, отбирали колонии, чувствительные к сахарозе, и проводили скрещивание. Клетки *P. putida* AK5, в которых произошел первый раунд рекомбинации, отбирали по устойчивости к гентамицину, варианты встраивания плазмиды определяли с помощью специфического праймера к хромосоме и универсального праймера M13rev к плазмиде, после чего 2 меродиплоида (с разными вариантами встраивания плазмиды) высевали на среду LB без антибиотика. После 16 ч культивирования делали серию десятикратных разведений и высевали на безсолевую LB с добавлением сахарозы (200 г/л). Клетки культивировали при температуре 8 °C в течение 5 сут (ни при 28, ни при 15 °C не удалось ингибировать рост меродиплоидов), после чего клоны, устойчивые к сахарозе, проверяли на чувствительность к гентамицину. Наличие мутантного аллеля идентифицировали с помощью ПЦР, корректность делеции подтверждали секвенированием.

Эффект метабитиков на рост пробиотических культур

Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by

Известно, что в многокомпонентных консорциумах бактерий со сходными пищевыми потребностями из-за различий в скорости роста штаммов, конкуренции за источники питания, присутствия антимикробных соединений, возможны изменения продукции тех или иных метаболитов, ферментов, витаминов и других биологически активных веществ.

Обнаружено подавление продукции молочной кислоты при совместном культивировании некоторых штаммов лактобацилл и лактококков по сравнению с монокультурами [1]. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* способен ингибировать рост *S. thermophilus* и *Lc. lactis*, но при этом не наблюдалось такого эффекта между штаммами лактококков и стрептококков. Ruiz с сотрудниками обнаружили, что по меньшей мере 16 белков *B. longum* и *B. breve* изменяют свою экспрессию при совместном культивировании [2]. Среди них – рибосомальные белки, вовлеченные в метаболизм углеводов, регуляцию генов, биогенез клеточной стенки и транспорт.

Анализ взаимодействия культур в смешанных бактериальных популяциях имеет несомненную практическую значимость для решения технологических проблем производства и повышения качества продукции.

Исследовано влияние бесклеточной культуральной жидкости отдельных бактерий – компонентов консорциума на их биологическую активность. В начале роста, одновременно с инокулятом, в питательную среду добавляли метабитик (центрифугат культуральной жидкости бактерий), находящихся в экспоненциальной фазе развития культуры.

При дополнительном внесении в питательную среду для культивирования *Lactobacillus plantarum* внеклеточных продуктов метаболизма *Bifidobacterium adolescentis* в соотношении 9:1 показана стимуляция активности роста бактерий *Lb. plantarum* (см. таблицу).

Влияние внеклеточных продуктов метаболизма бактерий на рост и жизнеспособность *Lb. plantarum*

Образцы	pH	Биомасса, мг/мл	КОЕ/мл
<i>Lb. plantarum</i> (контроль)	4,41	1,6	2·10 ¹⁰
<i>Lb. plantarum</i> + центрифугат <i>B. adolescentis</i> (9:1)	4,37	2,2	2,5·10 ¹⁰
<i>Lb. plantarum</i> + центрифугат <i>Lb. plantarum</i>	4,4	1,81	5·10 ⁹

Установлено, что активность β-галактозидазы в культуральной жидкости *Lb. plantarum* существенно возрастала при внесении внеклеточных продуктов

метаболизма культуры *B. adolescentis*, находящейся в экспоненциальной фазе развития в нулевую точку роста лактобацилл. Также отмечен стимулирующий эффект на активность β - и α -галактозидазы внеклеточных продуктов метаболизма клеток *Lb. plantarum* в экспоненциальной фазе развития (см. рисунок).



Активность β - и α -галактозидазы (усл. ед) в культуральной жидкости *Lb. plantarum* при внесении внеклеточных продуктов метаболизма: 1 – *Lb. plantarum* (контроль); 2 – *Lb. plantarum* + центрифугат *B. Adolescentis*; 3 – *Lb. plantarum* + центрифугат *Lb. plantarum*

Таким образом, установлен пребиотический эффект бесклеточных фракций культуральной жидкости, включающих продукты метаболизма пробиотических бактерий. Результаты исследования показали, что для коррекции физиолого-биохимических характеристик бактерий – компонентов поливидового консорциума, целесообразно использование метабиотиков.

Список использованных источников

1. Radke-Mitchell, L. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review / L. Radke-Mitchell, E. Sandine // J. Food Prot. – 1984. – Vol. 47. – P. 245–248.
2. Coculture of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* alters their protein expression profiles and enzymatic activities / L. Ruiz [et al.] // Int. J. Food. Microbiol. – 2009. – Vol. 133. – P. 148–153.

Применение микроорганизмов для поиска новых амилоидогенных белков человека

Рябина М.В.¹, Зелинский А.А.¹, Рубель А.А.^{1,2}

¹Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия,
электронный адрес: marina.ryabinina.v@gmail.com

²Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Амилоиды – устойчивые к детергентам надмолекулярные белковые комплексы, часто ассоциируемые с некоторыми нейродегенеративными заболеваниями, диабетом и раком. Однако биологическая роль амилоидов не ограничивается участием в патологических процессах. Известны примеры функциональных амилоидов, участвующих в формировании биопленок у бактерий (белки Curli у *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. и др.), в поддержании долговременной памяти у беспозвоночных (белок Orb2 у *Drosophila melanogaster*, белок СРЕВ у моллюска *Aplysia*), выполняющих структурную роль (белки спidroины шелка паутины) [1]. Ввиду широкого спектра биологических функций поиск новых белков, способных формировать нерастворимые амилоидные агрегаты, представляет большой интерес для научного и медицинского сообщества.

Для поиска новых потенциально амилоидогенных белков в нашей лаборатории применяются различные подходы, включающие использование биоинформатических алгоритмов с последующей проверкой предсказаний в экспериментальных моделях. Перспективным объектом для исследования амилоидогенного потенциала белков являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как было показано, что амилоидные агрегаты в клетках данного микроорганизма обладают свойствами, схожими с таковыми у амилоидов млекопитающих. В нашей лаборатории под руководством профессора Ю.О. Чернова была разработана дрожжевая тест-система, основанная на исследовании изменений фенотипа генно-модифицированных штаммов *S. cerevisiae* в результате продукции рекомбинантных амилоидогенных белков, слитых с репортерами. Используя данную тест-систему, нами исследован амилоидный потенциал широкого спектра белков человека, амилоидогенность которых ранее была предсказана биоинформатическими методами. Свойства белков, продемонстрировавших способность к формированию амилоидных агрегатов в дрожжевой модели, в настоящее время исследуются *in vitro*, применяя специализированные штаммы *E. coli*, и *in vivo*. Таким образом, применение микроорганизмов позволяет производить поиск новых амилоидогенных белков человека и улучшить предсказательную способность биоинформатиче-

ских алгоритмов. Полученные данные способствуют лучшему пониманию роли образования амилоидов в норме и при патологиях.

Работа выполнена при поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 94 031 363).

Список использованных источников

1. Functional mammalian amyloids and amyloid-like proteins / M.S. Rubel [et al.] // *Life*. – 2020. – Vol. 10, № 9. – P. 1–10.

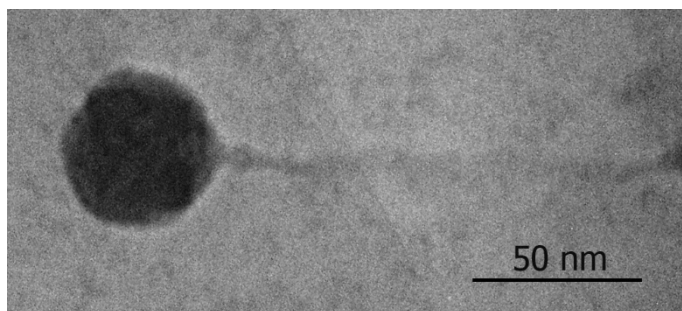
Характеристика бактериофага БИМ BV-113, активного в отношении бактерий *Glutamicibacter halophytocola*

Савич В.В., Герасимович А.Д., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.,
Сидоренко А.В.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: savichvv@list.ru*

Род *Glutamicibacter*, предложенный в 2016 году, включает некоторые виды бактерий, ранее входившие в состав рода *Arthrobacter* и выделенные из него на основании различий в нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и ряда хемотаксономических признаков. Фаги этих бактерий в настоящее время слабо изучены, и подробно описаны только два вируса, инфицирующие *Glutamicibacter arilaitensis* [1]. Данная работа посвящена характеристике фага, активного в отношении бактерий *Glutamicibacter halophytocola*.

Бактериофаг БИМ BV-113 вместе с бактерией-хозяином *G. halophytocola* БИМ В-1594 выделен из образца почвы, отобранного в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси (Минск, Беларусь). С помощью трансмиссионной электронной микроскопии установлено, что бактериофаг имеет типичную морфологию сифовируса с икосаэдрической головкой диаметром 50 нм и несокращающимся хвостом длиной 140 нм (см. рисунок).



Морфология вириона бактериофага БИМ BV-113

Изучение спектра литической активности бактериофага БИМ BV-113 показало, что он лизирует только бактерию-хозяина *G. halophytocola* БИМ В-1594 и не инфицирует культуры близкородственных бактерий *Glutamicibacter nicotianae* БИМ В-5, *G. nicotianae* БИМ В-391 Д, *G. arilaitensis* БИМ В-1303 Г, *Arthrobacter citreus* БИМ В-3, *Arthrobacter pascens* БИМ В-10, *Arthrobacter crystallopoietes* БИМ В-13, *Arthrobacter pityocampae* БИМ В-339, *Arthrobacter woluwensis* БИМ В-896, *Arthrobacter agilis* БИМ В-1543. Бактериофаг БИМ BV-113

проявлял литическую активность в широком диапазоне температур инкубации (от 18 до 30 °С) и рН среды (от 2 до 12). Однако следует отметить, что количество активных вирусных частиц было больше при пониженной температуре. Бактериофаг БИМ BV-113 оказался устойчивым к действию высоких температур (полная инактивация происходила только после 10 мин инкубации при 80 °С) и 10 % хлороформу (снижение количества активных вирусных частиц с $4,46 \times 10^8$ до $8,4 \times 10^7$ БОЕ/мл за 2 ч инкубации).

Последовательность генома бактериофага БИМ BV-113 была секвенирована и депонирована в базу данных ГенБанк НЦБИ (номер доступа MZ955870). Геном исследуемого фага представлял собой кольцевую двухцепочечную ДНК, что не характерно для хвостатых бактериофагов, обычно содержащих линейную ДНК. Геном размером 43 694 п. н. содержал 65 белок-кодирующих последовательностей (БКП). Примерно 36 БКП (55,4 %) кодируют гипотетические белки с неизвестной функцией. Продуктом БКП BV113_00010 является интегразы, которая, согласно сведениям литературы, обеспечивает встраивание фагового генома в бактериальную хромосому. Наличие интегразы позволяет предположить, что фаг БИМ BV-113 относится к умеренным вирусам. Обнаружено 10 генетических локусов, кодирующих белки, которые, вероятно, участвуют во взаимодействии с ДНК: ДНК-связывающие белки, или белки с ДНК-связывающим доменом (BV113_00030, BV113_00040, BV113_00060, BV113_00100, BV113_00120, BV113_00360), экзонуклеазу (BV113_00080), метилтрансферазу (BV113_00150), резольвазу (BV113_00210) и большую субъединицу терминазы (BV113_00370). Ещё 14 предсказанных БКП кодируют капсидные белки или белки, участвующие в морфогенезе капсида. Последовательность BV113_00130, вероятно, кодирует NrdH-подобный глутаредоксин. Аминокислотные последовательности локусов BV113_00020, BV113_00110 и BV113_00230 имели высокий уровень сходства с последовательностями металлопептидазы, АТФазы семейства AAA и белка семейства ead/Ea22 (белки ранней фазы, способствующие развитию вируса по лизогенному пути).

Согласно данным филогенетического анализа, исследуемый бактериофаг БИМ BV-113 имел наиболее высокий уровень сходства с профаговой последовательностью в геноме бактерий *G. halophytocola* M10 (номер доступа CP104918.1, покрытие 45 %, идентичность 78,67 %), а также последовательностями геномов фагов *Glutamicibacter* phage Montesquieu (номер доступа OV696619.1, покрытие 12 %, идентичность 68,96 %) и *Arthrobacter* phage TripleJ (номер доступа NC_049470.1, покрытие 11 %, идентичность 66,62 %).

Список использованных источников

1. Virulent Phages Isolated from a Smear-Ripened Cheese Are Also Detected in Reservoirs of the Cheese Factory / T. Paillet [et al.] // *Viruses*. – 2016. – Vol. 14, № 8. – P. 1620.

Сравнительная оценка гидрофобных свойств клеточной поверхности и способности к адгезии у лактобацилл

Сафонова М.Е., Найденко И.А., Денисенко В.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

Способность бактерий прикрепляться к органическим и неорганическим поверхностям является важным фактором выживания в окружающей среде. На первом этапе прикрепление бактериальных клеток к поверхности обусловлено физико-химическими (электростатическими, гидрофобными, вандерваальсовыми) взаимодействиями. Этот процесс принято называть неспецифической адгезией. Есть сведения о том, что поверхностная гидрофобность клеток может выступать в качестве фактора неспецифической адгезии. Бактерии с более выраженной гидрофобностью характеризуются более высокой аутоагрегацией и адгезией к эпителиальным клеткам кишечника [1, 2].

В работе использовали штаммы молочнокислых бактерий *Lactiplantibacillus plantarum* M10, *Lactiplantibacillus paraplantarum* КП, *Lacticaseibacillus paracasei* Ш, *Lacticaseibacillus rhamnosus* M8, *Limosilactobacillus fermentum* M9. Гидрофобность клеточной поверхности оценивали по распределению клеток бактерий между водной и органической фазами при смешивании бактериальной суспензии с органическими растворителями (хлороформом и гексадеканом). Способность исследуемых лактобацилл к адгезии и формированию микробных биопленок изучали в условиях *in vitro* в лунках иммунологических планшетов. Сформировавшиеся биопленки окрашивали раствором кристаллического фиолетового, экстрагировали связанный краситель в растворе уксусной кислоты и измеряли поглощение при 540 нм.

Установлено, что исследуемые культуры молочнокислых бактерий отличаются по степени сродства к хлороформу и гексадекану. Наиболее гидрофобными оказались штаммы бактерий *L. paracasei* Ш, *L. plantarum* M10, *L. fermentum* M9 (рис. 1).

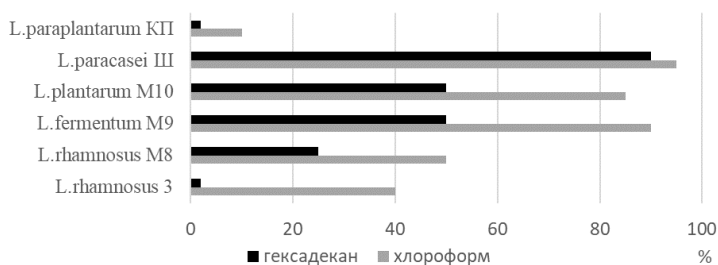


Рис. 1. Гидрофобность клеточной поверхности исследуемых бактерий

Ізучэнне адгезіі ісследуемых бактэрыяў паказала, што клеткі штамаў *L. paracasei* Ш і *L. plantarum* М10 абладаюць большымі адгезіўнымі ўласцівасцямі па сраўненні з іншымі культурамі (рыс. 2).

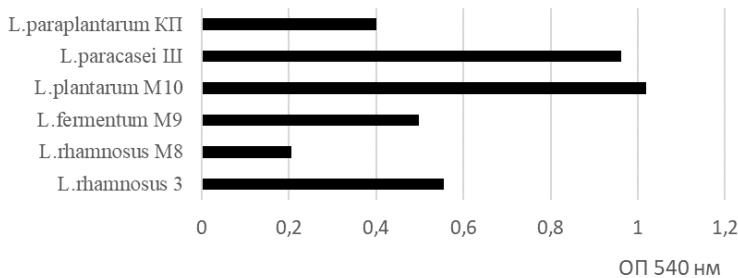


Рис. 2. Адгезія ісследуемых бактэрыяў

Такім чынам, устаноўлена, што штамы бактэрыяў *L. paracasei* Ш і *L. plantarum* М10 з выражэннымі гідрафобнымі ўласцівасцямі абладаюць высокай спосабнасцю к адгезіі.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hirt, H. Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin / H. Hirt, S. Erlandsen, G. Dunny // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 2299–2306.
2. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries / B. Kouidhi [et al.] // Microb. Pathog. – 2010. – Vol. 49. – P. 14–22.

Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов, выделенных из рыбных пресервов

Семенчукова Е.А., Муратова А.А., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: eka2105@mail.ru*

Микроорганизмы, устойчивые к экстремальным условиям существования, не только встречаются в природных экосистемах, но и также могут быть найдены в местах, не ассоциирующихся, на первый взгляд, с экстремальными условиями обитания. В 2022 году на базе лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси были выделены 3 изолята микроорганизмов из пресервов «Сельдь атлантическая филе в масле» (изготовитель СП «Леор Пластик» ООО), хранившихся в заводской упаковке с соблюдением условий хранения. Отобранные изоляты были названы LEORB, LEORT, LEORS. Данные микроорганизмы могут расти при температуре +4 °С и содержании до 80 г/л хлорида натрия в среде культивирования, а также, предположительно, могут продуцировать липолитические ферменты. Целью данного исследования являлась видовая идентификация штаммов LEORB, LEORT, LEORS.

Для первичной идентификации использовали метод матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ ВП МС) тотальных клеточных белков по стандартной методике [1]. Данный метод основан на сравнительном анализе спектров тотальных клеточных белков изучаемых микроорганизмов со спектрами белков микроорганизмов, присутствующими в референсной базе данных прибора-анализатора. Снятие спектров проводили в автоматическом режиме на масс-спектрометре «microflex LRF MALDI-TOF» («Bruker Daltonics», Германия), диапазон спектра – 2000–20 000 Да. Таким образом идентифицировали до вида *Candida famata* штамм LEORT, до рода *Psychrobacter* штамм LEORS. Штамм LEORB с помощью данного метода идентифицировать не удалось.

Поскольку полученные с помощью МАЛДИ ВП МС данные оказались недостаточными для точной идентификации всех штаммов, дальнейшее определение таксономической принадлежности штаммов LEORB и LEORS проводили путем сравнения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов рибосомных РНК и случайных фрагментов генома изучаемых штаммов с последовательностями из базы данных ГенБанк [2]. Метод сравнения участков рибосомных генов оказался более эффективным и позволил отнести штамм LEORB к виду *Staphylococcus epidermidis* (процент идентичности 96,32 %), а штамм LEORS – к роду *Psychrobacter* (процент идентичности 96,21 %). Срав-

нение случайных фрагментов генома изучаемых штаммов с базой данных Ген-Банк показало такие же результаты, однако процент идентичности искомой последовательности с референсной для штамма LEORS был значительно ниже (78,86 %).

Результаты идентификации штаммов LEOR разными молекулярно-генетическими методами представлены в таблице.

Результаты идентификация микроорганизмов

Наименование штамма	Идентификация с помощью секвенирования, процент идентичности		Идентификация с помощью МАЛДИ ВП МС	
	генов рНК	случайных фрагментов генома	Результат идентификации	Параметр достоверности
LEORB	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , 96,32 %	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , 96,74 %	<i>Escherichia coli</i>	1,718 (Возможная идентификация рода)
LEORT	–	–	<i>Candida famata</i>	2,334 (Высоко вероятная идентификация вида)
LEORS	<i>Psychrobacter</i> sp., 96,21 %	<i>Psychrobacter</i> sp., 78,86 %	<i>Psychrobacter</i> sp.	2,343 (Высоко вероятная идентификация вида)

Таким образом, с помощью МАЛДИ ВП МС была определена таксономическая принадлежность штаммов LEORT и LEORS. С помощью сравнения нуклеотидных последовательностей различных фрагментов генома до вида был определен штамм LEORB, а также подтверждена принадлежность штамма LEORS к роду *Psychrobacter*.

В дальнейшей работе планируется определение липолитической активности данных микроорганизмов и их устойчивости к различным стрессовым факторам.

Список использованных источников

1. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria / A. Mellmann [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, № 6. – P. 1946–1954.
2. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query [Electronic resource]. – Mode of access: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. – Date of access: 22.03.2023.

Механизмы солиubilизации фосфора бактериями и место этих знаний в рабочей программе дисциплины «Физиология микроорганизмов»

Сидоренко М.Л.

*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия,
электронный адрес: sidorenko@biosoil.ru*

В течение длительного времени исследователи пытались увеличить количество доступного для растений фосфора с помощью микроорганизмов, высвобождающих фосфор из нерастворимых соединений. В некоторых случаях микробная мобилизация фосфора является единственным возможным способом увеличения доступного для растений фосфора. Большинство исследователей связывают солиubilизацию фосфора с выделением органических кислот, ни один из них не смог найти связи между количеством органической кислоты в культуральном растворе, с одной стороны, и солиubilизированным фосфором, с другой. Таким образом, можно предположить, что существуют и другие факторы, которые вовлечены в этот процесс, и существуют альтернативные пути солиubilизации фосфора. В почвах фосфор часто связан с кальцием. На сегодняшний день известен ряд частично сбивающих с толку подробностей о солиubilизации фосфатов кальция микроорганизмами. Поэтому целью работы было собрать информацию о механизмах растворимости, надеясь таким образом пролить некоторый свет на этот вопрос и дополнить информацию, подаваемую студентам, обучающимся по направлению микробиология.

Выделяют три основных механизма солиubilизации фосфора микроорганизмами: химический (образование органических кислот, гидроксильных ионов, углекислого газа и других соединений, растворяющих минералы), биохимический (высвобождение внеклеточных ферментов) и биологический (деградация субстрата). Наибольший интерес вызывает химический путь солиubilизации фосфора из труднорастворимых неорганических соединений.

В работе использовали 4 бактериальных изолята, обладающих фосфат-солиubilизирующей, фитопротекторной и ростстимулирующей активностью в отношении зерновых культур. Бактериальные изоляты выделяли из образцов сельскохозяйственных почв, вовлеченных в длительный опыт (74 года) по внесению удобрений (Приморский край, Россия). Эксперимент проводили с использованием трикальций фосфата как источника нерастворимого фосфора. Кроме того, использовали два разных источника азота (нитрат натрия и сульфат аммония) и углерода (глюкоза и фруктоза).

В результате исследований выявили, что солиubilизация неорганического фосфора напрямую связана с падением рН, вызванным бактериями. Для уве-

личения солюбилизации фосфора необходим азот в аммонийной форме, нитратный азот не влияет на скорость процесса. Бактерии ассимилируют NH_4^+ высвобождая ионы водорода (эксекреция ионов водорода). В результате падает рН и высвобождается больше фосфора. Кроме того, источники углерода также влияют на высвобождение ионов фосфора. Так, кислотность активнее снижалась при добавлении в среду глюкозы в качестве единственного источника углерода. Кислотность среды при добавлении фруктозы, при прочих равных условиях, снижалась значительно меньше.

Таким образом, установлена роль ионов водорода в химическом пути солюбилизации неорганического фосфора бактериями. Результаты этих исследований включены в раздел «обмен веществ у бактерий» курса дисциплины «Физиология микроорганизмов» для студентов, обучающихся по направлению «Микробиология».

Корректировка результатов метатаксономических экспериментов: внесение поправок на число копий генов 16S рРНК, рассчитанных согласно базам данных RiboGrove и *rrnDB*

Сиколенко М.А., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: sikolenko@bio.bsu.by*

Под метатаксономическим анализом понимается метод определения таксономического состава сообществ микроорганизмов, основанный на секвенировании участков маркерных генов (например, генов 16S рРНК) и последующей классификации полученных данных. Результатом является количество прочтений (a_i), относящихся к каждому из выявленных таксонов. При интерпретации результатов постулируется, что проценты a_i отражают относительную представленность (процент клеток – c_i) соответствующих организмов в сообществе. Одним из факторов, отдаляющих проценты a_i от истинных значений c_i , является тот факт, что геномы различных микроорганизмов содержат различное число копий генов 16S рРНК (g_i). Действие искажающего фактора заключается в ложном завышении оценок c_i для организмов с большими g_i .

Снизить силу воздействия данного фактора можно на этапе компьютерной обработки данных секвенирования. Подход заключается в том, чтобы нормировать a_i на g_i . Существует как минимум 3 компьютерные программы, выполняющих такое нормирование: PICRUSt2, CopyRighter и parica. Однако единственное исследование, оценивающее эффективность данных программ, продемонстрировало, что их эффективность неудовлетворительна [1].

Возможно, что лимитирующим фактором для повышения эффективности данных программ является неполнота баз данных (БД), которые хранят значения g_i , и которыми пользуются данные программы. Эти БД были составлены в начале 2010-х годов и, закономерно, уступают в представленности таксонов современным базам данных: RiboGrove [2] и *rrnDB* [3]. Последние основаны на БД RefSeq – наиболее полном общедоступном хранилище полных геномов прокариот – и регулярно обновляются.

Нами было выполнено сравнение эффективности работы программ PICRUSt2 и CopyRighter при использовании ими четырёх баз данных.

БД по умолчанию соответствующей программы (сокращённо БД^М).

БД, основанной на RiboGrove 11.217 (выпуск от 21.03.2023).

БД, основанной на *rrnDB* 5.8 (выпуск от 23.06.2022).

БД, основанной на RiboGrove 11.217 с модификацией: копия гена 16S рРНК учитывается только в том случае, если парой праймеров к варибельным участкам, которые секвенировались, может быть сформирован ПЦР-продукт, согласно результатам компьютерного моделирования ПЦР. Далее в тексте RiboGrove 11.217 с модификацией сокращенно обозначается RiboGrove^M.

Нами были проверены следующие нулевые гипотезы:

гипотеза H_1 . Эффективность RiboGrove не отличается от БД^{УМ};

гипотеза H_1^M . Эффективность RiboGrove^M не отличается от БД^{УМ};

гипотеза H_2 . Эффективность *rrnDB* не отличается от БД^{УМ};

гипотеза H_3 . Эффективность RiboGrove не отличается от *rrnDB*;

гипотеза H_4 . Эффективность RiboGrove не отличается от RiboGrove^M.

Для проверки гипотез использовали общедоступные данные секвенирования семи различных участков генов 16S рРНК из трех искусственных сообществ микроорганизмов: Zymo, Ziell и Ziel2 (8, 13 и 19 бактериальных штаммов, соответственно; количество секвенированных образцов: 21, 14 и 21, соответственно) [4]. Каждая из пяти гипотез проверялась отдельно для каждой из шести комбинаций «сообщество-программа». Всего проведено 30 проверок.

Для отклонения нулевой гипотезы есть основания в нескольких случаях.

Гипотеза H_1 ; программа PICRUSt2; сообщества Zymo, Ziell. Характер отличий – в обоих случаях эффективность RiboGrove выше, чем БД^{УМ}.

Гипотеза H_1^M ; программа PICRUSt2; сообщества Zymo, Ziell. Характер отличий – в обоих случаях эффективность RiboGrove^M выше, чем БД^{УМ}.

Гипотеза H_3 ; программа PICRUSt2; сообщество Zymo. Характер отличий – эффективность RiboGrove выше, чем *rrnDB*.

Таким образом, статистически значимое повышение эффективности нормирования по сравнению с БД по умолчанию наблюдалось только для программы PICRUSt2 при использовании RiboGrove 11.217 (как с модификацией, так и без).

За единственным исключением, не наблюдалось статистически значимых отличий между эффективностью нормирования при использовании RiboGrove по сравнению с *rrnDB*.

Не наблюдалось статистически значимых отличий между эффективностью нормирования при использовании RiboGrove с модификацией по сравнению с RiboGrove без модификации.

Если отсутствие статистически значимого повышения эффективности нормирования является ложным, то причины этого могут быть следующими: 1) малый размер выборки; 2) различия в номенклатуре таксонов между различными базами данных. Таким образом, для уточнения результатов необходимо учесть различия в номенклатуре и расширить выборку.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Louca, S. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem / S. Louca, M. Doebeli, L.W. Parfrey // *Microbiome*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 41.
2. Sikolenko, M.A. RiboGrove: a database of full-length prokaryotic 16S rRNA genes derived from completely assembled genomes / M.A. Sikolenko, L.N. Valentovich // *Research in Microbiology*. – 2022. – Vol. 173, № 4. – P. 103936.
3. *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development / S.F. Stoddard [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, № D1. – P. D593–D598.
4. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing / I. Abellan-Schneyder [et al.] // *mSphere*. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. e01202-20.

Скрининг осмотолерантных дрожжей для кормопроизводства

Слайковский С.Н.¹, Крицкая Л.А.¹, Сапунова Л.И.², Кулиш С.А.²

¹ООО «БСЛ-Генетикс Компани», Минск, Беларусь,
электронный адрес: bslgenetics@gmail.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Высокие темпы роста населения, численность которого на Земле к 2050 г. достигнет 9,1 млрд человек, предполагают не менее чем двукратное увеличение мирового производства продовольствия, что трудно достижимо. Это связано с множеством проблем, среди которых изменение климата, природные катаклизмы; сокращение площадей, отводимых под сельскохозяйственные угодья; потери урожая за счет вредителей и болезней, использование растений для получения биотоплива; постоянно растущие цены на нефть, влекущие за собой увеличение стоимости удобрений, кормов и др. Самым прогрессивным решением проблемы является повышение усвояемости и питательной ценности кормов за счет введения в их состав биологически активных добавок, среди которых особое место занимают живые (активные) дрожжи и продукты их метаболизма [1].

Известные эффекты от использования активных дрожжей, которые, например, в рационе жвачных животных выражаются в улучшении усвояемости концентрированных кормов, стимуляции привесов у молодняка, повышении продуктивности, улучшении качественного состава молока и мяса, являются следствием деятельности дрожжей как в рубце, так и в пострубцовых отделах пищеварительной системы. Хотя механизм воздействия дрожжей на организм жвачных животных до конца остается неясным, достоверно установлено улучшение кислотного режима в рубце. Напрямую не влияя на кислотность, дрожжи стимулируют жизнедеятельность аборигенной микробиоты этого отдела пищеварительного тракта. В пользу отмеченного свидетельствует повышенное количество продуктов метаболизма пропионата – маркера активно и полноценно усваиваемых кормов. Дрожжи также повышают биодоступность минеральных компонентов корма, способствуя их трансформации в хелатные формы, активизируют анаэробную микрофлору (целлюло- и ксиланолитиков) за счет потребления кислорода и синтеза витаминов, аминокислот, ферментов, полисахаридов, других биологически активных соединений [2, 3].

Полисахариды дрожжей, наряду с другими перевариваемыми волокнами кормов (пектином, некоторыми гемицеллюлозами), не всасываются в тонком кишечнике, но являются источником короткоцепочечных жирных кислот – пропионовой, масляной, уксусной, обладающих выраженным противовоспалительным, противоопухолевым действием, поддерживающих микробное равновесие и целостность слизистой кишечника [4, 5]. Пролонгированный

положительный эффект от применения дрожжей обеспечивается их способностью размножаться в рубце, в значительной степени зависящей от осмото-лерантности.

Цель настоящей работы состояла в выделении из углеводсодержащих субстратов, имеющих признаки микробной контаминации, осмото-лерантных микроорганизмов и оценке их полисахаридсинтезирующей способности.

Выделение чистых культур микроорганизмов проводили общепринятым в микробиологии методом. Их осмото-лерантность оценивали в условиях глубинного культивирования в минеральной питательной среде, содержащей кукурузный экстракт в качестве ростстимулирующего агента и крахмальную ферментированную патоку в качестве источника углерода. Интенсивность роста микроорганизмов оценивали спектрофотометрически (кварцевая кювета с длиной светопоглощения 1 мм, ОП₆₀₀) и количеством колониеобразующих единиц (КОЕ, ед/мл). О способности синтезировать полисахариды судили по характерной слизистой поверхности колоний исследуемых культур или количественно после выделения из фильтрата культуральной жидкости.

В результате скрининга было изолировано 9 культур микроорганизмов, представленных бактериями и дрожжами. Из них в условиях опыта только у 3 изолятов обнаружено свойство синтезировать полисахариды. Все исследуемые микроорганизмы росли в жидких средах, содержащих до 20 % патоки в пересчете на редуцирующие вещества. При этом продолжительность лаг-фазы роста культур в средах с 5–20 % углеводов увеличивалась незначительно и составляла 4–6 ч. Практически не зависел от концентрации патоки и рост культур: количество их жизнеспособных клеток в культуральной жидкости варьировалось в пределах от $0,52 \times 10^9$ КОЕ/мл (5 %) до $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл (20 %). Однако выход микробных полисахаридов внеклеточной локализации повышался с увеличением содержания в среде углеводов. По-видимому, высокое осмотическое давление, являющееся основной причиной гибели клеток, компенсируется синтезом полисахаридов и, возможно, трегалозы и глицерола.

Список использованных источников

1. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия / А.Г. Лобанок [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 1. – С. 17–22.
2. Amin, A.B. Influence of yeast on rumen fermentation, growth performance and quality of products in ruminants: A review / A.B. Amin, S. Mao // *Animal Nutrition*. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P 31–41.
3. Effects of a blend of live yeast and organic minerals as an alternative to monensin on intake, digestibility, performance and beef quality of Nellore bulls finished on pasture with high concentrate supplementation / M. S. Soares [et al.] // *Agriculture*. – 2023. – Vol. 13. – P. 522. doi: org/10.3390/agriculture13 030 522
4. *In vitro* investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids / J. Luo [et al.] // *J. Integr. Agric.* – 2017. – Vol. 16. – P. 1566–1575.
5. Role of Long Chain Fatty Acids in Developmental Programming in Ruminants // J. A. Roque-Jiménez [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, № 3. – P. 762. doi: 10.3390/ani11 030 762

Генетическая гетерогенность *Mycobacterium tuberculosis* генотипа Beijing: подтипы b0/w148 и 94-32

Слизень В.В., Суркова Л.К.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: niipulm@tut.by

Эпидемиология туберкулеза в современных условиях в Республике Беларусь характеризуется сохранением высокого удельного веса множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза, увеличением в этиологической структуре доли *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) с преширокой лекарственной устойчивостью к фторхинолонам (2019 – 9,4 % случаев туберкулеза, 2022 – 18,4 % (среди впервые выявленных пациентов); 2019 – 13,5 %, 2022 – 33,7 % (среди ранее леченых)), что может быть связано с распространением определенных генетических вариантов МБТ. Для Беларуси актуальными являются МБТ генотипа Beijing, которые доминируют в этиологической структуре туберкулеза. Генотип Beijing неоднороден, на основании MIRU–VNTR типирования в нем выявляют 24 типа, из которых генетические подтипы 100-32 (или B0/W148) и 94-32 представляют самые многочисленные группы. Штаммы МБТ подтипа Beijing 94-32 повсеместно распространены в России, составляя 40–50 % популяции МБТ генетического семейства Beijing, преобладают в странах Средней Азии (например, в Казахстане до 90 % штаммов МБТ относятся к генотипу Beijing, в Узбекистане – 24,7 % всех исследованных штаммов, в Таджикистане – 23,8 %, в Кыргызстане – 22,9 %) [1].

Цель работы – оценить структуру МБТ генетического семейства Beijing и определить частоту встречаемости МБТ генотипа Beijing подтипов B0/W148 и 94-32.

Определение МБТ генотипа Beijing подтипа B0/W148 проводили в соответствии с ранее описанным методом [2]. МБТ генотипа Beijing подтипа 94-32 характеризуются мутацией в 98-м кодоне гена *sigE*, сопровождающейся заменой CTG→СТА (позиция 1 364 706) в геноме МБТ H37Rv (код доступа NC_000 962.3). Для детекции мутации использовали праймеры (по 20 пкмоль каждого), амплифицирующие фрагмент *sigE* гена размером 154 п. о., и парные зонды (по 10 пкмоль каждого), специфичные к «дикому» и мутантному 98-му кодону *sigE* гена – CTG98СТА (прямой праймер – F1 GCACCGCCGTATTCGACG, обратный – R3 CTGATAAAGGTCTCCTGGGTCAG; зонд к «дикому типу» 98-го кодона – W–ctg294 FAM–AAGCCAGCCGGTACACCCGA–BHQ1, зонд к мутантному кодону M–cta294 R6G–TAAGCTAGCCGGTACACCCGA–BHQ1). В реакционную смесь (50 мкл) также вносили MgCl₂ – 3 мМ, дНТФ (2 мМ

дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) – 5 мкл, 10X Таq буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5 мкл, бетаин 5M – 5 мкл, трегалозу 5M – 5 мкл, воду деионизованную – add 40 мкл, изучаемую ДНК – 10 мкл, Таq полимеразу – 2,5 ед. Детекцию флюоресценции осуществляли на стадии отжига ($67^\circ\text{C} - 75^\circ\text{C}$) на канале R6G и FAM.

Проведено определение частоты выделения МБТ генетического семейства Beijing и его подтипов V0/W148 и 94/32 в разные годы: 2012 – 2013, 2016 – 2018, 2020 – 2021 гг. (см. таблицу). Всего изучено 474 изолята МБТ, при этом 315 изолятов МБТ относились к генотипу Beijing ($66,45 \pm 2,17\%$), из которых к подтипу V0/W148 принадлежали 208 изолятов ($43,88 \pm 2,28\%$) и к подтипу Beijing 94/32 – 18 ($3,8 \pm 0,88\%$), к другим генотипам (не Beijing) относилось 159 культур МБТ ($33,55 \pm 2,17\%$).

Генотипическая структура *M. tuberculosis* МБТ в многолетней динамике (2012–2021 гг.)

Период наблюдения	Суммарно Beijing, %	Количество	Генотипы и субтип МБТ					
			V0/W148		Не Beijing		Beijing 94-32	
			абс.	% (95 % ДИ)	абс.	% (95 % ДИ)	абс.	% (95 % ДИ)
2012–2013	64,93	77	28	36,36 (18,5–54,2)	27	35,06 (17,1–53,1)	–	–
2016–2018	66,50	236	107	45,33 (35,9–54,8)	79	33,47 (23,1–43,9)	18	7,62 (–4,6–19,9)
2020–2021	66,33	161	73	45,34 (33,9–56,8)	53	32,91 (20,3–45,6)	–	–
Всего	474	474	208	43,88 (37,1–50,6)	159	33,54 (26,2–40,9)	18	3,78 (–5,0–12,6)

Таким образом, МБТ генотипа Beijing доминируют в этиологической структуре туберкулеза: на их долю приходится 64,93–66,55 % изолятов. МБТ генотипа Beijing неоднородны и представлены, преимущественно, подтипом V0/W148 (на его долю от всех изолятов МБТ приходится 36,36–45,34 %) и подтипом Beijing 94-32.

Список использованных источников

1. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in the “closed” Russian town with limited population migration/ T. Umpeleva [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 79. – P. 1–6.
2. Полногеномное секвенирование изолята *Mycobacterium tuberculosis*: клиническое и эпидемиологическое значение/ В.В. Слизень [и др.] // *Здравоохранение*. – 2020. – № 11. – С. 5–16.

Сорбция свинца и кадмия ксеро- и психротолерантными микромицетами архивной пыли

Тригубович А.М.¹, Гончарова И.А.², Соколова Т.В.³, Сосновская Н.Е.³

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: trigubovich777@gmail.com

²Белорусский научно-исследовательский институт документоведения
и архивного дела, Минск, Беларусь

³Институт природопользования НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Основой большинства архивных документов является бумага, структурную основу которой составляет целлюлоза. С течением времени происходит самопроизвольное распадение целлюлозных макромолекул на мелкие фрагменты, образующие архивную пыль, вдыхание которой нередко оказывает значительное негативное влияние на здоровье людей. Кроме целлюлозы архивная пыль содержит и другие компоненты минеральной и биологической природы. Бумага, обладающая высокой гигроскопичностью, легко колонизируется оппортунистическими микромицетами [1], опасность которых может возрастать вследствие высокой сорбционной способности по отношению к токсикантам, включая тяжелые металлы [2].

Исследована сорбционная активность микромицетов, выделенных из пылевых частиц архивных документов, по отношению к высокотоксичным металлам свинцу и кадмию, содержащихся в применявшихся ранее природных пигментах. В качестве объектов исследования отобрано 5 быстрорастущих ксеро- и психротолерантных штаммов, способных развиваться в условиях высокой ($a_w = 0,98$) и низкой ($a_w = 0,85$) доступности воды, в температурном диапазоне 5–28 °С с оптимумом при 15 °С, что близко микроклиматическому режиму архивохранилищ. Критерием ростовой активности служил выход биомассы в газонной культуре.

Сорбцию металлов глубинным мицелием оценивали по уменьшению содержания соответствующих ионов после контакта с растворами солей $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 0,05 ммоль при определении сорбционной емкости и 10 мг/г при расчете коэффициента распределения K_d . Содержание ионов металлов в растворах до и после сорбции определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии. При изучении влияния биоцидной обработки на сорбционную активность грибов биомассу на 30 мин погружали в 1 % раствор бензалконииум хлорида.

Исследования показали, что сорбционная емкость нативного мицелия по отношению к ионам свинца варьировала от 7,7 у *Paecilomyces variotii* до 10,3 мг/г у *Aspergillus niger*, а по отношению к ионам кадмия – от 5,0 мг/г у *Tri-*

choderma viride до 8,5 мг/г у *A. niger*. Учитывая тот факт, что *A. niger* характеризуется способностью выделять в окружающую среду значительное количество органических кислот, воздействие которых повышает мобильность тяжелых металлов, даже кратковременное развитие этого гриба на документах может представлять серьезную опасность здоровью пользователей и работников архивов. После высыхания фрагменты мицелия и грибные споры легко переходят в состав витающей пыли, а предельно допустимые концентрации в воздухе для свинца и кадмия составляют всего 0,0003 мг/м³.

Для борьбы с плесневыми грибами широко используют антисептическую обработку составами, содержащими бензалкониум хлорид (ВАС) в концентрации 1–2 %. Покоящиеся споры микромицетов характеризуются высокой устойчивостью к негативному воздействию факторов внешней среды, включая биоциды. После 30 минутной экспозиции проб архивной пыли в 1 % растворе ВАС количество колониеобразующих единиц (КОЕ) и скорость их развития только возрастали. Вегетативный мицелий исследованных грибов после воздействия ВАС утратил жизнеспособность, но сорбционная активность при этом возросла. У *P. variotii* сорбционная емкость по отношению к ионам свинца повысилась в 2 раза, у других грибов она также увеличилась, хотя и не столь значительно. По отношению к иону кадмия эта закономерность проявилась даже в большей степени, сорбционная емкость у большинства грибов превысила 15 мг/г.

Важной характеристикой сорбции металлов является коэффициент распределения K_d , показывающий отношение концентрации сорбируемого вещества в сорбенте к его концентрации в растворе: для свинца K_d варьировал от 341 до 510 мл/г, для кадмия – от 85 до 131 мл/г. После обработки биоцидом этот параметр возрос в 2–7 раз.

Избежать негативных последствий биоцидной обработки документов позволит систематический микологический контроль объектов архивного хранения.

Список использованных источников

1. Borrego, S. fungi involved in biodeterioration of documents in paper and effect on substrate / S. Borrego, P. Guiamet, I. Vivar, P. Battistoni // Acta Microscopica.– 2018.– Vol. 27, № 1. – P. 37–44.
2. Скугорева, С. Г. Биосорбция тяжелых металлов микромицетами: особенности процесса, механизмы, кинетика / С.Г. Скугорева, Г.Я. Кантор, Л.И. Домрачева // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 2. – С. 14–31.

Морфолого-культуральные свойства *Morchella importuna* при выращивании на естественных и искусственных питательных средах

Хархасова И.А., Константинов А.В., Острикова М.Я., Коваленко С.А.

Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь,
электронный адрес: harhasova18@mail.ru

Плодовые тела представителей рода Сморчок характеризуются содержанием широкого спектра веществ, имеющих важное медико-биологическое значение [1]. Основными критериями отбора штаммов микроорганизмов для практического применения выступают различные культуральные особенности чистой культуры, зависящие от широкого многообразия факторов внешней среды, физических (температура, влажность, освещенность и т. д.) и химических, в первую очередь состава и кислотности питательной среды [2].

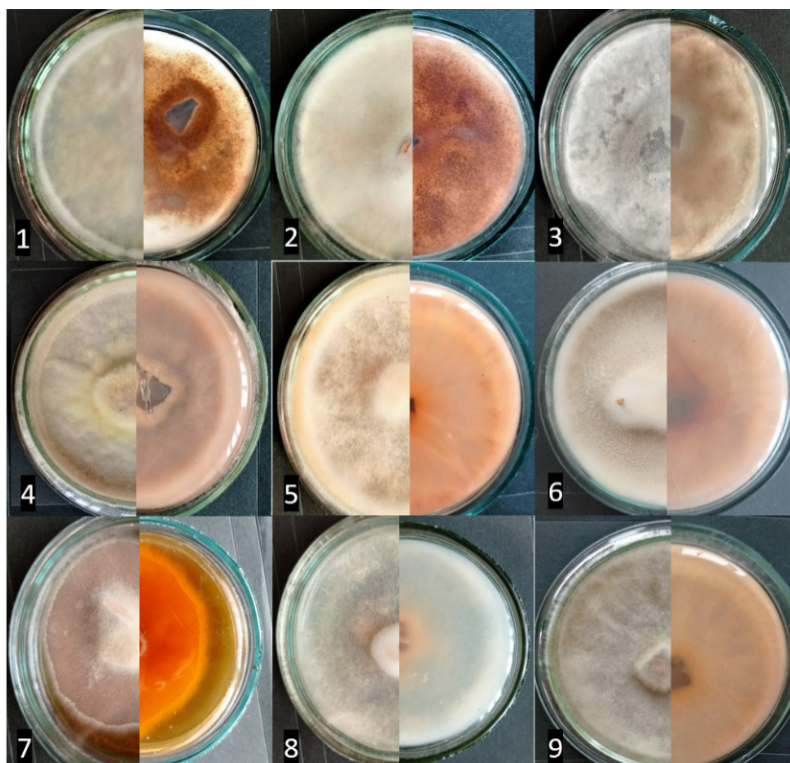
Целью данной работы являлось получение данных о ростовых показателях и морфологических признаках мицелия *Morchella importuna* (М. Куо, O'Donnell, T.J. Volk, 2012) при выращивании на различных естественных и искусственных питательных средах. Для проведения исследований чистая культура была взята из коллекции штаммов грибов Института леса НАН Беларуси (FIB). Штамм FIB – 332 генетически верифицирован и депонирован в базу NCBI: OQ694 816.

Для выявления оптимальных питательных сред и сравнительного изучения морфологических особенностей *M. importuna* чистую культуру пересеивали и культивировали согласно общепринятым методикам [2] на средах: сусло-агар 4 % (4 %CA) – контроль, сусло-агар 10 % (10 %CA), среда Сабуро, среда Чапека, картофельно-глюкозный агар (КГА), среда по прописи Murashige-Skoog (MS), MS с половинной концентрацией макросолей ($\frac{1}{2}$ MS), $\frac{1}{2}$ MS с полуторной концентрацией микросолей, железа и витаминов ($\frac{1}{2}$ MSm), $\frac{1}{2}$ MS дополненная 10 % сусла ($\frac{1}{2}$ MS + 10 %C). Водородный показатель сред доводили до pH = 5,7. Культивировали на протяжении двух недель в термостате при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Рост колоний проходил крайне интенсивно: так, уже на вторые сутки после инокуляции ростовые показатели мицелия варьировали в диапазоне от 31 до 80 мм, а на седьмые сутки на всех питательных средах, за исключением среды Сабуро, наблюдалось полное обрастание поверхности среды. Цвет мицелия на средах $\frac{1}{2}$ MS + 10 % CA, 4 % CA и Сабуро идентифицирован как желтоватый, на среде $\frac{1}{2}$ MSm сероватый, на среде 10 % CA – кремовый, а на остальных средах – молочный. Форма колоний отмечалась как круглая с войлочной поверхностью и бархатистой на среде Сабуро. На всех средах, кроме MS, $\frac{1}{2}$ MSm, $\frac{1}{2}$ MS + 10 %C, отмечался плоский профиль колонии с уменьшением высоты мицелия

к центру колонии, на остальных профиль бугристый, а на среде $\frac{1}{2}$ MSm – с каплевидным центром.

Инверсум (реверс) на всех вариациях питательной среды MS отличался явными признаками ферментации, так же были отмечены изменения характера окраски питательной среды на вариантах с использованием сред 10 % СА, Сабуро и КГА, в то время как на средах 4 % СА и Чапека не было отмечено явных изменений в окраске и структуре субстрата. Морфологические особенности мицелия *M. importuna* отображены на рисунке.



Чистая культура *M. importuna* на различных питательных средах:
 1 – MS; 2 – $\frac{1}{2}$ MS; 3 – $\frac{1}{2}$ MSm; 4 – $\frac{1}{2}$ MS + 10 %С; 5 – 10 %СА; 6 – 4 %СА;
 7 – среда Сабуро; 8 – среда Чапека; 9 – КГА

Таким образом, для наработки мицелия *M. importuna* можно использовать все апробированные питательные среды. Отсутствие необходимости использования специфических факторов роста и нетребовательность к обилию пластических веществ, делают данный вид перспективным для практического применения. В дальнейшем планируется проведение исследований по длительному депонированию мицелия и подбору естественных субстратов для культивирования данного вида.

Список использованных источников

1. Sambyal, K. A comprehensive review on *Morchella importuna*: cultivation aspects, phytochemistry, and other significant applications / K. Sambyal, R.V. Singh // *Folia microbiologica*. – 2021. – Vol. 66. – № 2. – P. 147–157.
2. Alsohaili, S.A. Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the Northern Eastern desert of Jordan / S.A. Alsohaili, B.M. Bani-Hasan // *Jordan Journal of Biological Sciences*. – 2018. – Vol. 11, № 3. – P. 329–337.

Фитостимулирующие свойства штамма-нефтедеструктора *Rhodococcus qingshengii* F2-2

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

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия,
электронный адрес: filonov.andrey@rambler.ru

Обладая широкими катаболическими возможностями и разнообразными ферментными системами благодаря мозаичности и лабильности генома, актинобактерии рода *Rhodococcus* могут деградировать различные органические соединения, включая многие токсиканты [1]. Эти особенности, в сочетании со способностью выживать в неблагоприятных условиях среды, делают представителей рода *Rhodococcus* перспективными при разработке биопрепаратов для очистки загрязненных нефтепродуктами объектов окружающей среды. В настоящее время катаболический потенциал углеводородоокисляющих родококков изучен достаточно хорошо, однако, очень мало известно о фитостимулирующих свойствах и антимикробной активности родококков-нефтедеструкторов.

Штамм-нефтедеструктор *R. qingshengii* F2-2 выделен из почвы [2] нефтяного месторождения Фестивальное (ЯНАО). Способен расти в среде с гексадеканом, додеканом, ундеканом и деканом в качестве единственных источников углерода в широком температурном диапазоне (от 4 до 40 °С). При росте в среде с гексадеканом эффективно снижает поверхностное натяжение до 30 мН/м за счет продукции биосурфактантов трегалолипидной природы.

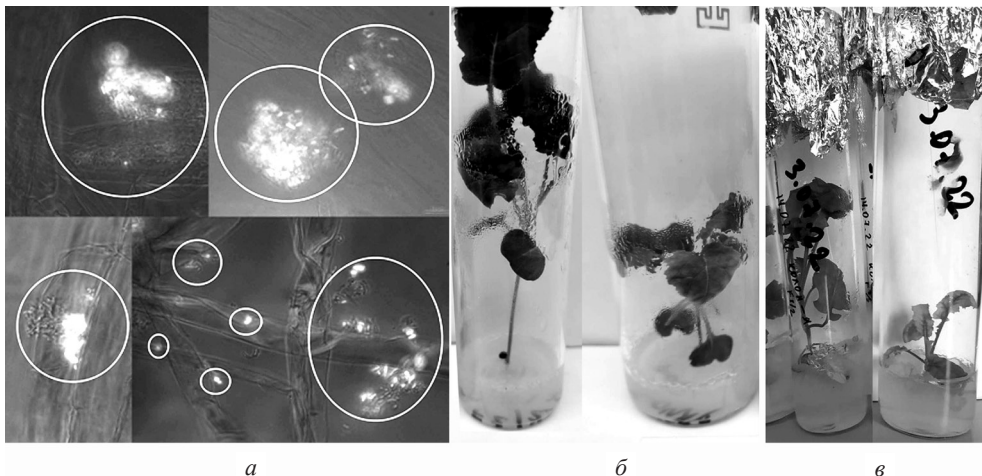
При поиске генных кластеров продукции вторичных метаболитов в геноме штамма *R. qingshengii* F2-2 нами обнаружен кластер генов биосинтеза феназинов на плазмиде pLP156, которые являются антибиотиками, подавляющими фитопатогенные грибы. Антимикробная активность штамма F2-2 в отношении фитопатогенных микромицетов приведена в таблице.

При экстрагировании феназинов штамма *R. qingshengii* F2-2 в качестве контроля был выбран штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, синтезирующий соединения феназинового ряда, а также стимулирующий рост растений [3]. Тонкослойная хроматография экстрактов культуральной жидкости обоих штаммов выявила спектр схожих интенсивно окрашенных пятен, что свидетельствует о наличии феназиновых соединений в культуральной жидкости штамма F2-2.

Радиус зон угнетения роста микромицетов бактериями-антагонистами, см

Штамм	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Gaeumannomyces graminis var tritici</i>
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> BS1393	4,0	3,5	4,0	4,3
<i>Rhodococcus qingshengii</i> F2-2	1,5	2,0	0	1,0

Экстракты культуральной жидкости обоих штаммов были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На ВЭЖХ-профиле пробы BS1393 обнаружен пик, соответствующий по времени удержания феназинкарбоновой кислоте. Несмотря на то, что феназинкарбоновая кислота в экстракте культуральной жидкости штамма *R. qingshengii* F2-2 не была обнаружена, можно предположить наличие других феназиновых соединений, продуцируемых этим штаммом.



Взаимодействие *R. qingshengii* F2-2 с проростками горчицы: *а* – колонизация корешков горчицы клетками штамма F2-2; *б* – ростстимулирующее действие штамма на горчицу через четыре недели (колонизированное растение и проросток без колонизации); *в* – защитный эффект штамма для проростка горчицы, зараженного фитопатогенным микромицетом *F. graminearum* (колонизированное растение и проросток без колонизации)

Для изучения колонизации растений штамм F2-2 был трансформирован плазмидой pMySA_gfp, содержащей ген белка зелёной флуоресценции *gfp*, который даёт возможность колониям светиться в УФ-свете. Листья проростков горчицы были обработаны суспензией штамма F2-2. С использованием флуоресцентной микроскопии продемонстрирована колонизация листьев и корней горчицы исследуемым штаммом (см. рисунок, *а*). Ростстимулирующий эффект штамма F2-2 показан на рисунке, *б*.

Для изучения защитных свойств штамма F2-2 горчица и рапс были заражены *Fusarium graminearum*. Через 10 суток мы наблюдали активный рост горчицы, колонизированной исследуемым штаммом. У горчицы, не обработанной штаммом F2-2, наблюдали признаки заболевания: замедление роста и пожелтение листьев (см. рисунок, в).

Таким образом, штамм-нефтедеструктор *R. qingshengii* F2-2 стимулирует рост рапса и горчицы, колонизирует листья и корни горчицы, содержит кластер генов биосинтеза феназинов, обладает антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов.

Список использованных источников

1. Углеродородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов : атлас-монография / И.Б. Ившина [и др.] ; под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.
2. Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation / I.F. Puntus [et al.] // Journal of Soils and Sediments. – 2019. – Vol. 19, № 8. – P. 3166–3177.
3. Штаммы PGPR *Pseudomonas*, перспективные для создания биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений / Т.В. Сиунова [и др.] // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 2. – С. 56–67.

Генетическая регуляция формирования биопленки *C. tropicalis*

Черней И.С., Чешевиц В.Т.

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
 электронный адрес: semitcko.i@yandex.ru

Candida spp. является наиболее распространенным видом дрожжевых грибов в микробиоте человека, а также основным возбудителем внутрибольничных инфекций, в частности, пневмоний и инфекций мочевыводящих путей. Способность образовывать биопленку некоторых видов рода *Candida* обеспечивает снижение восприимчивости их к противогрибковым препаратам и защитным механизмам хозяина, приводя к осложнениям в лечении инфекции. Наиболее изученным микроорганизмом, способным образовывать биопленку, является *C. albicans*. В то же время наиболее часто выделяемым из биологических материалов является *C. tropicalis*, который обладает устойчивостью к широко используемым противогрибковым препаратам, таким как азолы. Цель работы – определить основные гены, ответственные за образование и резистентность к лекарственным средствам биопленки *C. tropicalis* для последующей разработки новых противогрибковых препаратов.

В таблице представлены ключевые гены, ответственные за фенотипическую устойчивость *C. tropicalis* к противогрибковым лекарственным средствам. Для поиска генов была использована база данных Gene NCBI и база данных белковых последовательностей UniProt. Полученная информация была соотнесена с литературными данными из базы PubMed.

Гены, ответственные за образование биопленки

Показатель	Ген	Биологическая функция
Морфогенез	UME6	Положительный регулятор транскрипции, ответственный за морфологию и формирование гиф
	PHR1	Адгезия к абиотическим поверхностям и инвазия эпителия
	CDC12	Формирование цитоскелета во время роста клеток
	EFG1	Активатор образования гиф
	WOR1	Регулятор переключения между двумя наследственными состояниями (белым и непрозрачным), участвует в адгезии клеток и росте псевдогиф
	ALS 1-3	Адгезия
Регулирование фенотипов	HWP1	Адгезин клеточной стенки гиф
	BCR1	Фактор транскрипции для регуляции продукции адгезина
Образование биопленки	RBT5	Филаментация клеток в биопленке
	NRG1	Положительный регулятор высвобождения зрелых клеток биопленки
	ERG11	Механизмы резистентности
	CDR1	Механизм резистентности (в частности, к азолам)
	MDR1	Ген, ответственный за лекарственную резистентность

Результаты анализа данных, представленные в таблице, показывают, что резистентность биопленки *C. tropicalis* является многофакторной и условно может быть разделена на две группы механизмов. Первая группа связана с механизмами формирования биопленки и адгезии к различным поверхностям. В частности, гены *ALS 1-3* и *HWP1* кодируют белки, связанные с процессами адгезии, в том числе и к буккальному эпителию человека. Сверхэкспрессия *WOR1* и *EFG1* способствует переходу клеток в другую (непрозрачную) фазу, при которой начинается процесс формирования биопленки. В свою очередь, гены *UME6* и *NRG1* участвуют в морфогенезе у *C. tropicalis*. Высокая экспрессия гена *UME6* снижает количество высвобождаемых клеток из биопленки, а низкая экспрессия гена *NRG1* наоборот их увеличивает.

Вторая группа механизмов связана с развитием лекарственной устойчивости клеток биопленки за счёт генов *CDR1* (устойчивость к азолам) и *MDR1* (множественная лекарственная устойчивость), экспрессия которых наблюдается в клетках биопленки и обеспечивает активный отток из клеток противогрибковых препаратов. Кроме того, к данной группе можно отнести ген *ERG11* повышенная экспрессия которого способствует непрерывному синтезу эргостерола, тем самым обеспечивая устойчивость структуры клеточных мембран и целостность клеток.

В настоящее время не существует специфических лекарственных препаратов с комплексным воздействием для преодоления лекарственной устойчивости клеток *Candida* в составе биопленок. Потенциальным лекарственным средством могут выступать эфирные масла, которые характеризуются разнообразием химических компонентов, входящих в их состав, и мишеней их биологического действия. Например, эфирные масла гвоздики и корицы проявляют противогрибковую активность к устойчивым к флуконазолу штаммам *C. albicans* [1]. Также использование эфирных масел или отдельных их компонентов в комплексе с уже известными лекарственными препаратами увеличивает их эффективность действия. Так, гераниол, содержащийся в эфирном масле герани, розы, лимонграсса, способен повышать активность флуконазола, подавляя активность специфических мембранных белковых насосов и нарушая структуру биопленки [1].

Таким образом, проведенный анализ генов, ответственных за образование биопленки, отражает многообразие механизмов, задействованных в устойчивости клеток *Candida* к лекарственным средствам, и определяет потенциальные мишени для исследования эффектов действия эфирных масел.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства образования.

Список использованных источников

1. Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils / A.M. El-Baz [et al.] // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10. – P. 81–85. doi: 10.3390/antibiotics10010081

Транскрипционный фактор SlyA фитопатогенных бактерий – сенсор растительных фенольных соединений

Шарангович М.А., Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: msharangovichus@gmail.com

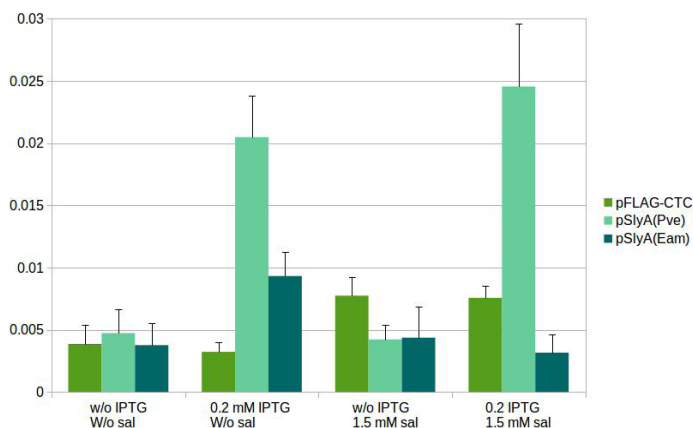
Растительные фенольные соединения играют важную защитную роль при бактериозах: многие из них имеют антибактериальную активность, а салициловая кислота является одним из модуляторов иммунного ответа. Некоторые патогены способны использовать салицилат и другие фенольные соединения как сигнал для контроля продукции факторов вирулентности. Подобная регуляция фенольными соединениями может происходить с участием транскрипционных факторов семейства MarR. Например, было показано ингибирующее действие салицилата на регулятор SlyA у *S. enterica* [1]. Данные о влиянии растительных фенолов на этот транскрипционный фактор у фитопатогенов в литературе на сегодня отсутствуют.

Ранее мы идентифицировали несколько генов *Pectobacterium versatile* 3-2, экспрессия которых менялась в присутствии растительных фенольных соединений [2]. Анализ регуляторных последовательностей этих генов с помощью программы SigmoID [3] выявил в трех случаях присутствие потенциального оператора для транскрипционного регулятора SlyA, что показало целесообразность более детального изучения этого транскрипционного фактора у фитопатогенных бактерий. В настоящей работе представлены результаты о характеристике транскрипционного фактора SlyA из двух белорусских изолятов фитопатогенных бактерий: *Pectobacterium versarile* 3-2 и *Erwinia amylovora* E2.

В ходе исследования был обнаружен неожиданный фенотипический эффект – токсичность экспрессии SlyA *P. versatile* и *E. amylovora* в клетках некоторых штаммов *E. coli*, что позволило провести скрининг растительных фенольных соединений и идентифицировать среди них три, способных инактивировать SlyA. Таковыми оказались салициловая, ванилиновая и коричная кислоты. Подтверждена регуляторная роль SlyA в отношении идентифицированных ранее фенол-индуцируемых/репрессуемых генов. Так, ген *OA04_07420* репрессуется салицилатом натрия и ванилиновой кислотой, а в его регуляторной области обнаружен сайт связывания SlyA. Гетерологичная экспрессия *slyA E. amylovora* E2 и сверхэкспрессия *slyA P. versatile* 3-2 в клетках *P. versatile* 3-2 препятствует ингибированию экспрессии гена *OA04_07420* салицилатом натрия и ванилиновой кислотой.

Известно участие SlyA в контроле пектолитической активности у *Dickeya dadantii* [4], однако информация о роли фенольных соединений в таком кон-

троле отсутствует. Анализ генома *P. versatile* 3-2 выявил сайты связывания SlyA перед тремя последовательными генами пектатглиз: *pelA*, *pelB* и *pelC*. Для *PelB* нам удалось подтвердить прямой транскрипционный контроль (активацию) в клетках *E. coli*, причем такая активация снималась добавлением салицилата для SlyA *E. amylovora*, но не *P. versatile* 3-2 (см. рисунок).



Все клетки содержали низкокопийную плазмиду с геном *pelB*, а также экспрессионный вектор pFLAG-CTC с геном *slyA* из *E. amylovora*, *P. versatile* или без вставки. Внутриклеточная пектолитическая активность выражена в условных единицах. Экспрессия гена *pelB* *P. versatile* 3-2 в клетках *E. coli* XL-1 Blue

Резюмируя полученные на сегодня данные, можно подчеркнуть, что SlyA может быть сенсором растительных фенольных соединений (для разных видов фитопатогенов), непосредственно контролирующим ключевые факторы вирулентности. Анализ геномных последовательностей показывает не менее 20 сайтов связывания этого транскрипционного фактора, и роль членов регулона SlyA в контроле взаимодействия с растением-хозяином заслуживает детального исследования.

Список использованных источников

1. The Evolution of SlyA/RovA Transcription Factors from Repressors to Countersilencers in *Enterobacteriaceae* / W.R. Will [et al.] // mBio. – 2019. – Vol. 10, № 2. – P. e00009-19, /mbio/10/2/mBio.00009-19.atom.
2. Игнатенко, Е.И. Идентификация новых факторов вирулентности *Pectobacterium carotovorum* / Е.И. Игнатенко, О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2018. – Vol. 10 – P. 58–68.
3. Nikolaichik, Y. SigmOID: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // Peer J. – 2016. – Vol. 4. – P. e2056.
4. SlyA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Is Essential for Virulence in *Dickeya dadantii* 3937 / M.M. Haque [et al.] // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, № 17. – P. 5409–5418.

Особенности жизнедеятельности анаэробного микробного сообщества при длительном контакте с отходами из вспененного полистирола

Ширинкина Л.И.¹, Тактарова Ю.В.¹, Дьяконова А.Т.¹, Гладченко М.А.², Котова И.Б.¹

¹*Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, электронный адрес lishirinkina@gmail.com*

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

Загрязнение окружающей среды различными видами пластика представляет одну из глобальных экологических проблем. В настоящий момент проводится активное изучение биodeградации полистирола – устойчивого полимерного ксенобиотика. Отсутствие гидролизуемых групп приводит к тому, что полистирол меньше подвержен минерализации и вызывает серьезное и продолжительное загрязнение [1].

Целью работы является изучение влияния длительного контакта с бытовыми отходами из вспененного полистирола (ПС) на структурно-функциональные особенности анаэробного микробного сообщества в метаногенных (МГ), сульфат- (СР) и нитратредуцирующих (НР) условиях и с добавлением доступных ко-субстратов.

Исходное микробное сообщество из ила очистных сооружений пивоваренного завода было ранее адаптировано к 2-аминобензойной кислоте (2-АБК). Культивирование осуществляли в жидкой минеральной среде [2] в герметичных стеклянных флаконах с замещением газовой фазы на аргон при 30 °С в течение 780 сут. ПС добавляли в виде пластин 1,5 × 4 см, вырезанных из подложек для овощей. В качестве ко-субстратов использовали пируват, лактат натрия и 2-АБК. Для создания НР и СР условий к минеральной среде добавляли до конечной концентрации 10 мМ NaNO₃ или Na₂SO₄, соответственно. Газообразные продукты метаболизма анализировали хроматографически каждые 30–40 сут.

Показано, что на 349-е сут культивирования микробное сообщество в МГ условиях с ПС, пируватом и 2-АБК продуцирует в 9 раз больше CH₄ и в 2,3 раза – CO₂, чем в контроле. В НР условиях с пируватом как ко-субстратом разница в продукции CH₄ для микробного сообщества с ПС составила до 100 раз, а CO₂ – до 8,8 раза. Также в вариантах с ПС был обнаружен предположительно N₂O в количестве до 0,6 мМ. В СР условиях превышение продукция газа над контролем составило 2,5 раза для CH₄; 3,5 для CO₂ и H₂S.

Увеличение срока культивирования повлекло дальнейшие изменения в метаболизме микробных сообществ. Так, на 720-е сут микробное сообщество в МГ условиях образует в 28 раз больше CH_4 и в 6 раз – CO_2 , чем в контроле. В НР условиях с пируватом как ко-субстратом разница в продукции CH_4 для микробного сообщества с ПС составила до 100 раз, а CO_2 – до 7,8 раза. В СР условиях превышение продукции газа над контролем составило 1,2 раза для CH_4 , 1,8 раза для CO_2 и H_2S .

Визуально заметно, что на поверхности ПС формируются микробные обрастания. По данным NGS-профилирования в исходном метаногенном сообществе преобладают представители родов *Lysinibacillus* (48,0 %) и *Brevibacillus* (19,9 %). Домен *Bacteria* при пороге отсечения 1 % представлен 20 таксономическими группами. Представители домена *Archaea* совокупно составляют 0,025 %.

При внесении ПС во всех вариантах повысилась степень разнообразия сообщества, при этом доля метаногенов родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium* выросла до 1,9–5,7 %, а бактерий родов *Lysinibacillus* и *Brevibacillus* – упала до 0,1–0,3 %. В сообществе в МГ, НР и СР условиях выявлено 29, 35 и 35 групп соответственно. В МГ условиях преобладающими стали *Sedimentibacter*, в НР и СР – *Lentimicrobium*. Зафиксировано появление новых групп: рода *Syntrophomonas* и сем. *Spirochaetaceae* в МГ, рода *Desulfitobacterium*, сем. *Spirochaetaceae*, *Geobacteraceae* и *Rikenellaceae* в НР и рода *Desulfovibrio* и сем. *Rikenellaceae* в СР условиях.

Увеличение длительности экспозиции ПС привело к уменьшению степени разнообразия сообщества, в сообществе в МГ, НР и СР условиях выявлено 18, 14 и 7 групп соответственно. В МГ условиях преобладающими стали *Anaerostignum*, в НР – *Petrimonas*, в СР – *Clostridium*. Доля метаногенов родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium* в МГ и НР сообществах выросла до 13,3–18,2 %.

Таким образом, присутствие ПС приводит к значительным изменениям в составе анаэробного сообщества и к увеличению выделения газов. Гравиметрия показывает 2,3 % убыли массы за 346 дней, однако поскольку для опытов был взят бытовой ПС, то, возможно, разрушается не сам полимер, а входящие в его состав пластификаторы, красители и т. д. При микроскопическом анализе культуральной жидкости опытных образцов (20 полей зрения) были обнаружены фрагменты микропластика в количестве 1 шт. в поле зрения в вариантах в МГ условиях, 4 шт. в вариантах в НР и 2 шт. в вариантах в СР условиях, что может являться косвенным признаком биодеструкции ПС.

Список использованных источников

1. Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации / И.Б. Котова [и др.] // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 6. – С. 627–659.
2. Tribedi, P. Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm / P. Tribedi, A.K. Sil // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2013. – Vol. 20. – P. 4146–4153.

Секция 2

**Микробный синтез биологически
активных веществ.**

**Генно-инженерное конструирование
микроорганизмов.**

Коллекции микроорганизмов

Some features of an acetoin biosynthesis by bacteria from the genus *Bacillus*

Geraskina N.V., Fedorova E.N., Kivero A.D., Stoynova N.V.

Joint-Stock Company "Ajinomoto Genetika Research Institute", Moscow, Russia,
e-mail: Natalia_Geraskina@agri.ru

Acetoin (3-hydroxy-2-butanone) is an important flavor compound, widely existing in dairy products and some fruits [1]. Because of its unique butter flavor, it can be used as flavor enhancer of dairy products, e. g. butter, cheese, coffee, beer, wine and nut. Also, acetoin has been showed as one of the volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting bacteria, PGPB, and promotes growth of model plants [2, 3]. Acetoin is excreted by many microorganisms characterized by the 2,3-butanediol type of fermentation.

Production of acetoin in industry can be achieved by microbial fermentation, enzymatic conversion and chemical synthesis from diacetyl or butanol. Compared with the chemical method and enzymatic conversion, microbial fermentation has many advantages: inexpensive raw materials, less environmental pollution, high purity of products, and mild reaction conditions. So, acetoin production by promising biotechnological microorganisms, *Bacillus* strains with GRAS (Generally Recognized As Safe) status, was studied.

We optimized the cultivation conditions for several *Bacillus* strains with potential application as PGPB, *B. mucilaginosus* strain 9338; *B. subtilis* strain 168 and *B. velezensis* strain FZB42 and *B. amyloliquefaciens* strains A50, BA1, NG342. Acetoin accumulation in the culture broth samples was measured by the improved UPLC method [4]. *B. amyloliquefaciens* strain NG342 producing more than 20 g of acetoin per 1 L of culture liquid was selected for further breeding. To enhance expression of the key enzymes of acetoin biosynthesis, α -acetolactate synthase and α -acetolactate decarboxylase, regulatory region of corresponding genes was modified to improve translation. This results in (i) 12-fold increase in specific activity of α -acetolactate synthase, which was differentially measured by specially developed protocol which allowed us to distinguish catabolic α -acetolactate synthase, AlsS, and biosynthetic acetohydroxy-acid synthase, IlvBH; (ii) slight increase in branched-chain amino acids, BCAA, accumulation, which biosynthesis is closely related to the biosynthesis of acetoin. But no significant improvement in acetoin production was detected presumably due to the low affinity of AlsS to pyruvate.

To improve conversion of carbon source into acetoin, the pyruvate conversion to lactate, one of the fermentation pathways alternative to 2,3-butanediol fermentation, was blocked. As a result of enhancement of the both expression of the key biosynthetic enzymes and lactate dehydrogenase disruption, 15 % higher acetoin ac-

cumulation was detected. Moreover, considering tight regulation of the key enzymes of acetoin biosynthesis and its further conversion into to 2,3-butanediol, influence of aeration conditions and organic acids addition on acetoin accumulation were investigated.

References

1. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin / H. Xu [et al.] // African Journal of Biotechnology. Academic Journals (Kenya). – 2011. – Vol. 10, № 5. – P. 779–799.
2. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* / C.-M. Ryu [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 134, № 3. – P. 1017–1026.
3. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* / C.-M. Ryu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2003. – Vol. 100, № 8. – P. 4927–4932.
4. HPLC and UPLC analyses of acetoin in bacterial culture fluid / E. Fedorova [et al.] // Acta Chromatographica. Akadémiai Kiadó. – 2015. – Vol. 27, № 4. – P. 613–622.

Enzymatic Production of biologically active peptides in plant materials

Gharaviri M., Ahangaran M., Fomenko I.A., Mashentseva N.G.

*Russian Biotechnological University, Moscow, Russia,
e-mail: gharaviri@hotmail.com*

Enzymatic hydrolysis, particularly by digestive enzymes, is the most common simple way for creating bioactive peptides because most of them are hidden or encrypted in the structure of mature proteins [1].

Peptides the majority of the bioactive peptides from plants that have been discovered are the breakdown byproducts of proteins, which are pharmaceutically inert in their natural state. Oral administration of the derived peptides is made feasible by the use of gastrointestinal enzymes to generate bioactive peptides. Bioactive peptides can pass through the intestines and reach the bloodstream in complete forms, where they can then exercise their biological effects [2].

Enzymatic hydrolysis of bioactive peptides can be performed from precursor proteins in three ways: (I) enzymatic hydrolysis by enzymes extracted from microorganisms or plants, (II) enzymatic hydrolysis by digestive enzymes, and (III) microbial fermentation. In some cases, a combination of (I) and (II) or (I) and (III) has been found to be effective in the production of short-chain peptides [3].

Bioactive peptides have been isolated from plant-based foods, according to a growing number of studies. Legumes, cereals, nuts, vegetables, fruits, and mushrooms are sources of plant bioactive peptides. Plant peptides are also claimed to have antimicrobial and antioxidant properties, as well as blood pressure and cholesterol-lowering effects, enhanced trace mineral absorption, cytoimmunomodulation, and opioid activity [2].

Because they are nontoxic, affordable, widely accessible, and have a variety of uses, plant-derived bioactive peptides have recently attracted increased interest in the areas of functional foods and medicines as suitable alternatives to animal sources. Another benefit for plant-based bioactive peptides is the lack of religious or social-cultural bias towards their utilization [2, 4].

The most popular method for creating bioactive peptides is to use specific or even nonspecific proteases because it takes less time to reach the desired level of hydrolysis and because it is easier to control the hydrolysis process to produce peptides with specific molecular weights and amino acid compositions. Several enzymes, including pepsin, bromelain, trypsin, chymotrypsin, and papain, are used in this process at their ideal pH and temperature levels. Digestive enzymes like pepsin and trypsin are principally used in the production of several known bioactive peptides. [1, 3].

When released from the precursor protein, plant-derived bioactive peptides display a variety of biological activities depending on the peptide sequence, amino acid

composition, chain length, chemical structure, and biological activities and mechanisms of these peptides. Once the amino acid sequence of the molecules is known, the peptides can be produced chemically or through recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) technology [5].

Currently, in order to produce biologically active peptides from the chickpea plant using animal enzymes (pepsin and trypsin), plant enzymes (bromelain and papain) and microbial enzymes (bacterial proteinase and fungal protease), research is being done and expected. In the near future, positive and practical results will be presented for use in the food and pharmaceutical industries.

References

1. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action / M. Akbari [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – P. 1445.
2. Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development / L. Hongcheng // *Journal of Future Foods.* – 2022. – Vol. 22. – P. 143–159.
3. Sánchez, A. Bioactive peptides: A review / A. Sánchez, A. Vázquez // *Food Qual. Saf.* – 2017. – Vol. 1. – P. 29–46.
4. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety / D. Bhandari [et al.] // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2020. – Vol. 26. – P. 139–150.
5. Karami, Z. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties / Z. Karami, B. Akbari-Adergani // *J. Food Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 56. – P. 535–547.

Drought and salt induced specific rhizosphere related bacteria enhance the adaptability of alfalfa to stress

Wenqiang Fan., Fengling Shi.

Key Laboratory of Grassland Resources of the Ministry of Education and Key Laboratory of Forage Cultivation, Processing and High-Efficiency Utilization of the Ministry of Agriculture, College of Grassland, Resources and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, China, e-mail: nmczysfl@126.com

Global climate change exacerbates the degree and duration of drought and salinization, which severely impacts crop yield and quality [1, 2]. The interaction between plants and the soil microbiomes that colonize the rhizosphere and root system is considered a key factor in enhancing plant adaptation to various stresses [3]. This study measured the changes in growth phenotypes, physiological and biochemical characteristics of alfalfa under sufficient water and drought stress, as well as non-salt and salt stress conditions under sterilized and non-sterilized soil conditions, and analyzed the composition and changes of rhizosphere bacterial communities using 16S rRNA high throughput sequencing.

We observed that the unsterilized treatment significantly improved the growth, and physiological and biochemical characteristics of alfalfa seedlings under drought and salt stress compared to the sterilized treatment (Fig. 1)

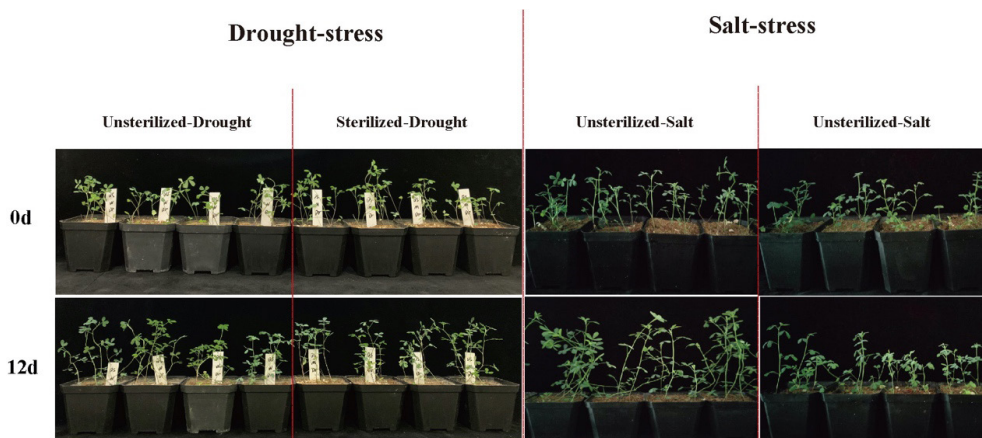


Fig. 1. Growth phenotypes of soil microorganisms on alfalfa under drought and salt stress

Drought and salt stress significantly changed the composition and abundance of microbial communities in the rhizosphere of alfalfa (Fig. 2).

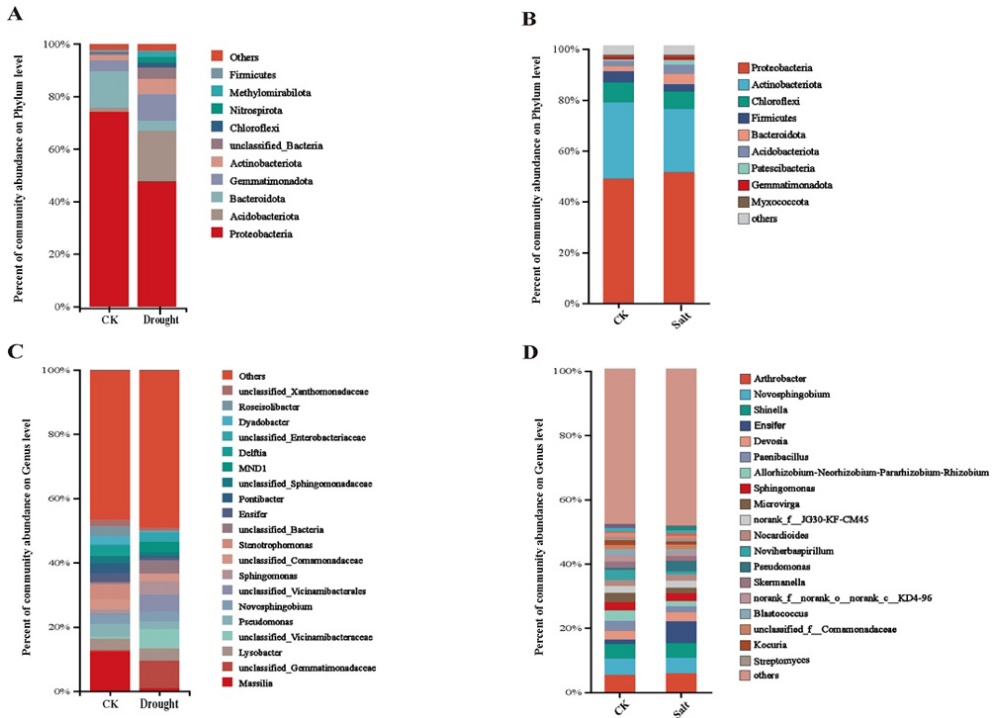


Fig. 2. Composition and abundance of microorganisms in the rhizosphere of alfalfa under drought and salt stress

As the second genome of plants, microbiomes have great potential to improve plant resistance. One future direction is to take rhizosphere microbiomes as one of the breeding objectives, and improve stress resistance and yield by transforming plant roots and recruiting beneficial microbiomes through rhizosphere secretions [4].

References

1. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation / M. Lamaoui [et al.] // *Frontiers in chemistry*. – 2018. – Vol. 6, № 26.
2. The sustainable utilization of saline resources for livestock feed production in arid and semi-arid regions: a model from Pakistan / B. Gul [et al.] // *Emirates Journal of Food & Agriculture*. – 2014. – Vol. 26, № 9. – P. 1032–1045.
3. Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion / A. Pascale [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1741.
4. Root exudates alter the expression of diverse metabolic, transport, regulatory, and stress response genes in rhizosphere pseudomonas / M. Olga, M. Janiece, R.P. Jacob // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 651282.

Исследование физиолого-биохимических свойств лактобактерий для применения в сыроделии

Абай Г.К.¹, Бержанова Р.Ж.², Чоманов У.Ч.¹

¹Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан,

электронный адрес: abay.gk@mail.ru, chomanov_u@mail.ru

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

В последние годы интенсивно развивается биотехнология получения сыров функционального назначения, которые помимо питательных ценностей применяются также для профилактики микробиологических нарушений в желудочно-кишечном тракте организма [1]. Традиционные сыры имеют в составе сложную микробиоту, которая выполняет важные функции с момента свертывания молока и в качестве вторичной микробиоты на протяжении всего созревания. Ферменты, вырабатываемые такими динамичными сообществами молочнокислых бактерий, поддерживают протеолиз и липолиз как главные факторы вкуса и текстуры сыра [2, 3]. Выделение и изучение физиолого-биохимических свойств потенциальных объектов заквасочных культур для производства функционального сыра является актуальной задачей пищевой биотехнологии.

Цель работы – исследование физиолого-биохимических характеристик 5 новых штаммов лактобактерий.

Объектами исследования служили новые лактобактериальные культуры, выделенные из коровьего, козьего молока и самосквашенного козьего сыра и идентифицированы как: *Lactiplantibacillus plantarum* CHE37, *Lactococcus lactis* 1881, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SDCM 5123, *Streptococcus macedonicus* LAB617, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S5K8

Физиолого-биохимические свойства лактобактерий оценивали по потреблению углеводов, накоплению молочной кислоты, устойчивости к разным концентрациям биологической жидкости макроорганизма (желчь), NaCl, значениям pH и фенола.

Для определения потребления углеводов лактобактериальными клетками был использован ряд углеводов: глюкоза, лактоза, сахароза, галактоза, мальтоза, ксилоза и маннит. Штаммы лактококков, выделенные из козьего и коровьего молока не сбраживали маннит и ксилозу, которых обычно мало в молоке и кисломолочных продуктах, тогда как наблюдалось слабое сбраживание данных углеводов культурами *Str. macedonicus* LAB617 и *L. plantarum* CHE37, изолированных из самосквашенного козьего сыра. Остальные углеводы одинаково хорошо сбраживаются всеми лактобактериями.

Кислотообразующую способность культур лактобактерий определяли методом титрования после 17 часов и 7 суток инкубации в стерильном молоке

при 37 °С. Из всех исследованных культур высокий результат показал штамм *L. lactis* 1881, энергия кислотообразования которого составила 91 °Т, предел кислотообразования равен 220 °Т.

Исследована устойчивость лактобактерий к различным концентрациям биологической жидкости макроорганизма – желчи (1, 5, 20, 30, 40 %). Желчь и содержащиеся в ней желчные кислоты предотвращают адгезию разных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника. По результатам исследования штаммы *L. plantarum* СНЕ37, *L. lactis* 1881, *Str. macedonicus* LAB617 показали высокую устойчивость. Остальные две культуры проявили устойчивый рост при присутствии в среде 20 и 30 % желчи.

Способность молочнокислых бактерий сохранять жизнедеятельность и расти в присутствии NaCl была исследована на среде с добавлением соли в концентрации от 0,5 до 6,5 %. Результат определяли по уровню роста через 24 ч культивирования при 37 °С. По данным исследования было выявлено, что все штаммы лактобактериальных культур устойчивы к 6,5 % NaCl, могут накапливать биомассу и показывают высокий процент выживаемости.

Определена выживаемость молочнокислых бактерий при разных значениях pH (3,2–9,6). Стрессовое значение pH 3,2 для *L. lactis* subsp. *lactis* S5K8 было ингибирующим, клетки потеряли жизнедеятельность, а в условиях значения pH 9,6 все культуры показали рост и выживаемость. Все объекты исследования толерантны к сильнощелочным реакциям питательной среды.

Устойчивость лактобактерий к фенолу определяли по росту на среде с концентрацией фенола 0,4 % после 24 ч при 37 °С культивирования. Все лактобактериальные культуры, кроме *L. lactis* subsp. *lactis* S5K8, которая выделена из коровьего молока, фенолустойчивые и обладают высокой жизнеспособностью.

Таким образом установлено, что штаммы *L. plantarum* СНЕ37, *L. lactis* 1881, *Str. macedonicus* LAB617 по всем исследованным физиолого-биохимическим свойствам обладают высокой устойчивостью. Данные результаты являются предпосылкой способности сохранения активности в процессе долгосрочного хранения ферментированных молочных продуктов функционального назначения, тем самым показывают перспективность штаммов для применения в качестве закваски.

Список использованных источников

1. Mathur, H. Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates / H. Mathur, T. Beresford, P. Cotter // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 1679.
2. The use of unique, environmental lactic acid bacteria strains in the traditional production of organic cheeses from unpasteurized cow's milk / А. Ёерека [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 3. – P. 1097.
3. Ржевская, В.С. Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий / В.С. Ржевская, И.П. Огурина, Л.М. Теплицкая // Уч. зап. Тавр. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Сер. «Биология, химия». – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 145–160.

Биоактивность меланинового пигмента эндофитного гриба *Cladosporium* sp. – HT207

Абдульмянова Л.И., Буриева М.Р., Рузиева Д.М., Насметова С.М.,
Гулямова Т.Г.

*Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: a_l_i_2020@mail.ru*

Меланиновые пигменты обладают различными биологически активными свойствами: радио- и фотопротекторными, антиокислительными и антиканцерогенными, противовоспалительными и иммуномодуляторными. Наличие меланиновых пигментов у микроорганизмов, в частности мицелиальных грибов, предполагает их широкое применение в медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве, в качестве доступных, легко возобновляемых и экологически чистых продуктов [1, 2].

Однако продукция меланина в эндофитных грибах является мало исследованной областью несмотря на то, что микробиота растений изобилует меланизированными эндофитами.

Нами были проведены исследования по выделению меланиновых пигментов из эндофитных грибов, ассоциированных с лекарственными растениями, и определению их биоактивности: цитотоксической, противовоспалительной, антиоксидантной [3].

Меланиновые пигменты выделяли из биомассы мицелия, полученного методом жидкофазной ферментации на картофельно-декстрозном бульоне при температуре 26 °С в течении 10 сут. Меланины экстрагировали щелочью под воздействием высоких температур с последующим осаждением кислотой.

Цитотоксическую активность определяли методом МТТ на линиях раковых клеток: эпителиальная карцинома шейки матки (HeLa), аденокарцинома молочной железы (HBL-100), аденокарцинома гортани (HEp-2). Стандартом сравнения являлся цисплатин. Противовоспалительную активность определяли методом ингибирования денатурации бычьего альбумина. Антиоксидантную активность определяли с использованием фосфорно-молибденового метода и нейтрализацией свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразола (ДФПГ) в условиях *in vitro*.

В результате исследований отобран штамм эндофитных грибов *Cladosporium* sp. – HT207, выделенный из клубня *Helianthus tuberosus*, произрастающего в предгорьях Чаткальского заповедника, показавшего одновременно сравнительно высокую активность по исследованным свойствам.

Так, сумма меланинов *Cladosporium* sp. – HT207 подавляла рост раковых клеток карциномы молочной железы на 50 % и карциномы шейки матки на 35 % (цисплатин угнетал на 98 и 70 % соответственно).

Наибольшая степень ингибирования бычьего альбумина выявлена при концентрации меланинов 500 мкг/мл и составила 82 %, что свидетельствует о высокой антиоксидантной активности меланиновых пигментов *Cladosporium* sp. – HT207, сравнимой с препаратами контроля: аспирин – 94 % и диклофенак – 96 %.

Наибольший показатель активности по фосфолибдату – 160 ЭАК/мг также обнаружен при концентрации 500 мкг/мл, а показатель способности удалять свободные радикалыДФПГ установлен на уровне 71 %.

Учитывая множество возможностей оптимизации методов культивирования эндофитного гриба, выделения суммарных экстрактов и обогащения меланиновых фракций, отобранный штамм *Cladosporium* sp. – HT207 из клубня *Helianthus tuberosus* может рассматриваться как весьма перспективный продуцент биоактивного меланина, а также в качестве субстанции с цитотоксическим, противовоспалительным и антиоксидантным эффектом.

Список использованных источников

1. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications / R. Sandra [et al.] // Ch. 4. – 2017. – P. 47–75.
2. Recent advances and progress on melanin-like materials and their biomedical applications / L. Huang [et al.] // Biomacromolecules. – 2018. – Vol. 19. – P. 1858–1868.
3. Diversity of endophytic fungi associated with medicinal plants of Uzbekistan and their biological properties. (Review) / T. Gulyamova [et al.] // Acta Microbiologica Bulgarica. – 2022. – Vol. 38/2. – P. 91–97.

Транскриптомный подход для поиска новых перспективных антимикробных ферментов *Lysobacter capsici* ВКМ В-2533^Т

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

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБ РАН, Пущино, Россия, электронный адрес: alex080686@mail.ru

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Распространение в обществе патогенных микроорганизмов, многократно-устойчивых ко всем известным антибиотикам, ведет к интенсивному поиску и выделению из окружающей среды продуцентов антибиотиков, антимикробных пептидов, бактериолитических ферментов.

В ИБФМ РАН изучаются бактерии рода *Lysobacter*, продуцирующие различные литические агенты. Установлено, что культуральная жидкости штамма *Lysobacter capsici* ВКМ-2533^Т обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Kocuria rosea*, *Staphylococcus aureus*), мицелиальных грибов (*Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus terreus*) и дрожжей (*Candida boidinii*, *Candida utilis*). Антимикробный потенциал этой бактерии может быть связан с продукцией бактериолитических ферментов, антибиотиков, а также со способностью образовывать внешнемембранные везикулы, которые могут нести в своем составе каждый из этих классов соединений. Как известно, литическая активность бактерий зависит от среды культивирования. Оптимальными средами для проявления бактериолитической активности *L. capsici* ВКМ В-2533^Т являются среды RM, SYM, KSP. Среда RM и KSP были выбраны для поиска и выделения бактериолитических ферментов *L. capsici* ВКМ В-2533^Т. Было выделено шесть бактериолитических ферментов, включая β-литическую протеазу, способную гидролизовать живые клетки клинического изолята *S. aureus* 55 (MRSA) (минимальная ингибирующая концентрация составляет – 2,85 мкг/мл). При этом, в процессе очистки этих ферментов, обнаружено наличие и других литически активных фракций. Поиск новых перспективных бактериолитических ферментов являлось целью данной работы.

Для поиска и идентификации бактериолитических ферментов мы провели транскриптомное исследование при культивировании штамма *L. capsici* ВКМ В-2533^Т на средах RM и SYM, на которых штамм проявлял антибактериальную и антифунгальную активность. В качестве контроля мы использовали среду 5/5, при культивировании на которой антимикробная активность отсутствует. В результате обнаружен пул генов, увеличивших свою экспрес-

сию. Среди них были как уже известные нам бактериолитические ферменты (в том числе β -литическая протеаза), так и неизученные ранее гидролитические ферменты, относящиеся к разным классам протеаз и гликозил-гидролаз. Для дальнейшей работы были выбраны гены, кодирующие сериновую протеазу Serp (UOF16 681.1), Serp3 (UOF12 968.1) и Serp5 (UOF13 168.1), увеличившие экспрессию в 3, 8 и 6 раз, соответственно. Белки Serp и Serp3 являются новыми ферментами, идентичны на 28 % лизинспецифической протеазе *L. enzymogenes* и на 49 % протеазе Л5 *L. capsici* XL1 (ранее *Lysobacter* sp. XL1) соответственно. Протеаза Serp5 идентична на 99 % белку Л5 *L. capsici* XL1. Получены гомологичные системы экспрессии для Serp, Serp3 и Serp5. Экспрессионные векторы для этих ферментов были сконструированы на основе разработанных нами ранее векторов pBBR1-MCS5 P_{T5}-GFP и pBBR1-MCS5 P_{GroEL(A)}-GFP. Для каждого из целевых белков была разработана схема очистки с учетом рI белков и с использованием колоночного метода хроматографии (аффинная хроматография, ионообменная хроматография и гель-фильтрация). В результате были получены бактериолитические белки Serp, Serp5, Serp3 в электрофоретически гомогенном виде. Определены оптимальные условия гидролиза автоклавированных клеток *S. aureus* 209P белками Serp, Serp3. Для Serp5 установлен спектр гидролиза белковых и бактериальных субстратов: азофибрин, казеин, эластин, гемоглобин, живые клетки *S. aureus* 209P, *M. luteus* Ac-2230^T и *K. rosea* Ac-2200^T. Также впервые была показана дрожжелитическая активность белка Л5 в отношении *Candida utilis*.

Таким образом, проведенные исследования открывают широкий горизонт перспектив для проведения дальнейшего поиска, выделения новых бактериолитических агентов и конструирования на их основе антимикробных препаратов нового поколения.

Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор контракта RF-193 021X0 001).

Сокультивирование микроскопических грибов как способ усиления их биотехнологического потенциала

Белоусова Е.Б., Юрченко Е.А., Юрченко А.Н.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
ДВО РАН, Владивосток, Россия,
электронный адрес: belousova_eb@piboc.dvo.ru

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что совместное культивирование предоставляет широкие возможности для получения потенциально новых природных соединений с широким спектром биологической активности [1]. Совместное культивирование позволяет смоделировать природный микробный комплекс, где микроорганизмы продуцируют биоактивные вторичные метаболиты, необходимые для выживания в конкурентном окружении [2].

Для исследования были отобраны семь монокультур грибов-микромитцев. Проведен анализ этилацетатных экстрактов монокультур и сокультур методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС.

Анализ полученных данных показал, что в ряде случаев совместное культивирование приводит к значительному изменению метаболизма и продуцированию новых полярных метаболитов. В других случаях происходит резкое изменение количества метаболитов, продуцируемых исходными монокультурами (рис. 1).

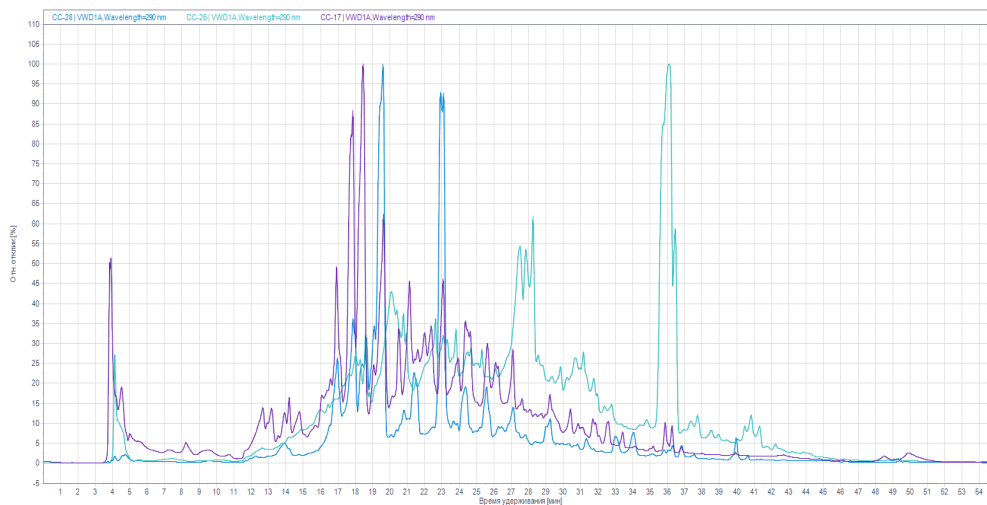


Рис. 1. ВЭЖХ-УФ хроматограмма экстрактов сокультуры (фиолетовый) и монокультур грибов *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 (зеленый), *Aspergillus fumigatus* КММ 4631(синий). Детекция при 290 нм

Данные ВЭЖХ-МС (рис. 2) позволили детектировать в экстракте совместных культур ряд соединений, синтезируемых монокультурами. Кроме того, было показано наличие в экстракте совместной культуры пиков соединений, отсутствующих в монокультурах грибов.

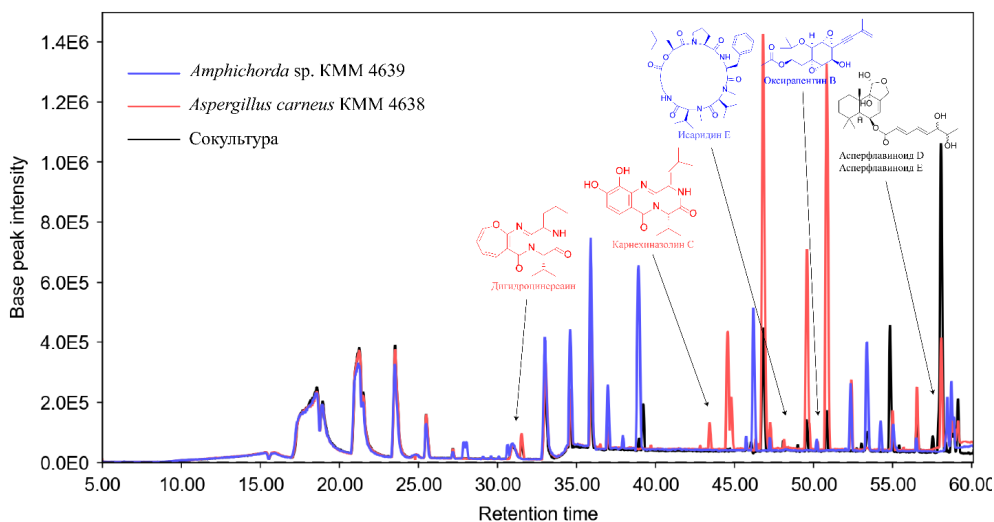


Рис. 2. ВЭЖХ-МС хроматограммы экстрактов совместной и монокультур грибов *Amphichorda* sp. KMM 4639 и *Aspergillus carneus* KMM 4638

Исследована биологическая активность этилацетатных экстрактов монокультур грибов и их консорциум. Анализ данных показал, что ряд образцов проявляет выраженную цитотоксическую активность в отношении гепатокарциномы НерG2, в концентрации 100 мкг/мл, снижая жизнеспособность клеток примерно на 40 %.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

Список использованных источников

1. Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms / X.Y. Peng [et al.] // MLST. – 2021. – Vol. 3, № 3. – P. 363–374.
2. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches / C. Pinedo-Rivilla [et al.] // Mar. Drugs. – 2022. – Vol. 20, № 2. – P. 1–34.

Выделение и характеристика термофильных бактерий, обладающих амилолитической активностью

Богатырева М.Д., Романова М.В., Белодед А.В.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, Россия,
электронный адрес: marykbogatyreva@gmail.com*

В настоящее время внимание научного сообщества привлекают бактерии, способные утилизировать различное сырье и отходы производства. При этом глубокая переработка компонентов сырья микроорганизмами во многом происходит под действием специфичных биокатализаторов – ферментов. Современная промышленность все чаще применяет ферменты для осуществления технологических процессов, в том числе широко используются препараты амилолитического действия, катализирующие гидролиз крахмала [1, 2]. При выборе продуцента в качестве перспективного варианта рассматривают использование термофильных культур, поскольку их ферменты характеризуются высокой термостабильностью и химической устойчивостью [3]. Актуальной задачей является поиск эффективных штаммов-продуцентов термостабильных амилаз. Таким образом, целью работы являлось выделение и характеристика термофильных штаммов, проявляющих амилолитическую активность.

Объектом исследования являлись штаммы термофильных бактерий, выделенные из различных природных образцов, таких как компост, торф, перегной. Для получения накопительных культур термофильных бактерий, образцы вносили в селективные питательные среды, культивировали при 50 °С в течение 24 часов с несколькими пересевами в жидкую среду и последующим высевом на агаризованную среду. Выделенные штаммы имели палочковидную морфологию клеток, окрашивались по Граму, некоторые штаммы образовывали споры. Среди 11 выделенных штаммов 8 были способны синтезировать органические кислоты, в частности молочную, уксусную и пропионовую. Протеолитической активностью обладали 6 культур, амилолитической – 8 и целлюлазной – 7. По совокупности морфологических и биохимических признаков, штаммы были предварительно отнесены к семейству *Bacillaceae*.

С целью первичного отбора штаммов-продуцентов амилаз, сравнивали диаметры просветления агаризованной среды с крахмалом вокруг колоний после добавления в среду йода (см. таблицу). Для количественного определения амилолитической активности штаммы культивировали в колбах с крахмалосодержащей средой в аэробных условиях. Культивирование проводили в течение 48 ч, затем супернатант, полученный после центрифугирования культуральной жидкости и ее разведений, инкубировали с крахмалом в лунках планшета

в течение 30 минут. После добавления йода измеряли оптическую плотность окрашенных растворов на планшетном фотометре Bio-Rad iMark при длине волны 655 нм. На основе оптической плотности проб была рассчитана суммарная активность амилаз в одном миллилитре культуральной жидкости у выделенных штаммов (см. таблицу)

Сравнение штаммов на основе диаметра зоны гидролиза на агаризованной среде и амилолитической активности культуральной жидкости

№ штамма	Диаметр зоны гидролиза, мм	Амилолитическая активность спустя 48 ч культивирования, мг крахмала/(мин·мл кж)
T1.1	30	Не определяли
T1.2	20	Не определяли
T1.3	40	Не определяли
T2.1	20	Не определяли
T2.2	180	136,73
T3.1	200	137,89
T3.2	230	142,56
T3.3	200	60,49
T4.1	110	110,47
T4.2	20	85,77
T5.1	0	Не определяли

Дополнительные исследования показали, что выделенные штаммы продуцируют амилазы при использовании в качестве субстрата кукурузной и соевой муки, что позволяет применять растительное крахмалосодержащее сырье в качестве источника углерода. Результаты определения амилолитической активности термофильных штаммов согласуются с литературными данными для альфа-амилолитической активности видов *Bacillus* [4]. Дальнейшие исследования могут быть посвящены разработке состава питательной среды с использованием компонентов растительного происхождения, в том числе крахмалосодержащих отходов различных производств, для получения термостабильных бактериальных амилаз.

Список использованных источников

1. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности / Л.В. Римарева [и др.] // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 5. – С. 63–74.
2. Farias, T.C. Microbial amyolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus / T.C. Farias, H.Y. Kawaguti, M.G.B. Koblitz // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2021. – Vol. 35, № 102054. – P. 1–12.
3. Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation / M.J. Msarah [et al.] // Heliyon. – 2020. – Т. 6, № e04183. – P. 1–9.
4. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products / B.T. Abd-Elhalem [et al.] // Annals of Agricultural Sciences. – 2015. – Vol. 60, № 2. – P. 193–202.

Подбор условий культивирования микроскопического морского гриба *Penicillium velutinum* КММ 4674 с помощью стратегии OSMAC

Боркунов Г.В.^{1,2}, Чингизова Е.А.², Лещенко Е.В.^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет, ИНТиПМ, Владивосток, Россия

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия,

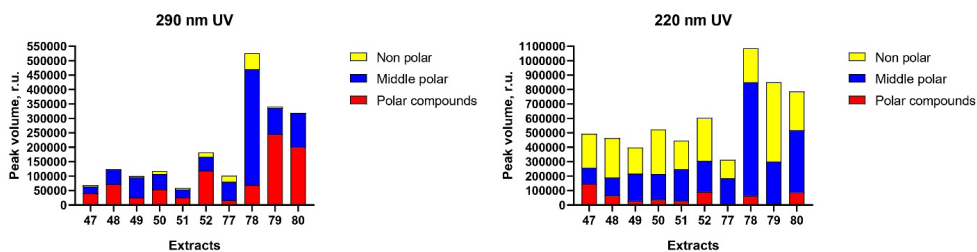
электронный адрес: gborkunov@gmail.com

Грибы рода *Penicillium* являются одними из наиболее распространенных наземных и морских грибковых организмов на планете [1]. Различные виды *Penicillium* продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, включая терпены [2], поликетиды [3] и меротерпеноиды [4]. Однако согласно теории OSMAC (один штамм – много соединений), при культивировании в условиях, максимально приближенных к естественным условиям обитания, биосинтетический потенциал микроскопических грибов зачастую раскрывается не полностью. Таким образом, одним из направлений исследований, набирающим популярность, является разработка стратегий и подбор условий для культивирования с целью повышения разнообразия и увеличения выхода биологически активных вторичных метаболитов микроорганизмами.

В данной работе была применена стратегия OSMAC с целью изменить метаболизм ранее изученного гриба *Penicillium velutinum* КММ 4674, который был выделен из морской травы *Zostera marina* Японского моря [5]. Для этого штамма была произведена реидентификация на основе молекулярно-генетических признаков, с использованием маркеров ITS и β -тубулина.

Аналитическое культивирование выполнено на рисовой среде с использованием морской воды в условиях солевого стресса (морская соль, 10, 20, 30, 40 и 50 г/л) и с добавлением 100 мкМ солей металлов (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}). Полученные экстракты проанализированы методами ТСХ, ВЭЖХ-УФ (см. рисунок) и ВЭЖХ-МС. Морская соль значительным образом не повлияла на хроматографический профиль гриба (экстракты 47–52), а добавление солей металлов значительно изменяло его (экстракты 77–80). Особо отмечен экстракт 78 (Fe^{3+}), так как содержит большую концентрацию среднеполярных соединений.

Таким образом, для дальнейшей оценки полученных экстрактов выполнена ВЭЖХ-МС для контрольного экстракта (47), для экстракта, полученного с добавлением 10 г/л морской соли (48), и для всех экстрактов полученных с добавлением солей металлов (77–80). Полученные ВЭЖХ-МС данные проанализированы с помощью метода главных компонент. Для полученных значений *k-mean* методом составлены кластеры, показывающие родство экстрак-



Общая площадь пиков в ВЭЖХ-УФ хроматограммах. Детекция при 220 нм и 290 нм

тов между собой. Дополнительно построена иерархическая дендрограмма, показывающая кластерное расстояние. В результате показано, что добавление солей Fe^{3+} при культивировании может оказывать значительный эффект на продуцирование вторичных метаболитов.

Для всех экстрактов была исследована цитотоксическая активность в отношении клеток рака простаты человека РС-3 и нормальных эмбриональных почечных клеток НЕК293, а также ингибирование роста *Candida albicans*. Большинство экстрактов снижало жизнеспособность клеток РС-3 и НЕК293 на 35–45 %. Влияние на рост *C. albicans* для всех экстрактов также было умеренным, около 40–50 %.

Исследование поддержано грантом РНФ № 22-73-00190.

Список использованных источников

1. Hawksworth, D.L. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 million species / D.L. Hawksworth, R. Lucking // *Microbiology spectrum*. – 2017. – Vol. 5, № 4.
2. A Review of terpenes from marine-derived Fungi: 2015–2019 / M. Jiang [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – P. 321.
3. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 / M.P. Sobolevskaya [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2016. – Vol. 79. – P. 3031–3038.
4. Two new meroterpenoids and two new monoterpenoids from the deep sea-derived fungus *Penicillium* sp. YPGA11 / Z. Cheng [et al.] // *Fitoterapia*. – 2019. – Vol. 133. – P. 120–124.
5. Zosteropenillines: polyketides from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* / S.S. Afyatullo [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2017. – Vol. 15. – P. 46.

Поликетиды морского микроскопического гриба *Penicillium raistrickii* КММ 4718

Боркунов Г.В.^{1,2}, Чингизова Е.А.¹, Лещенко Е.В.^{1,2}

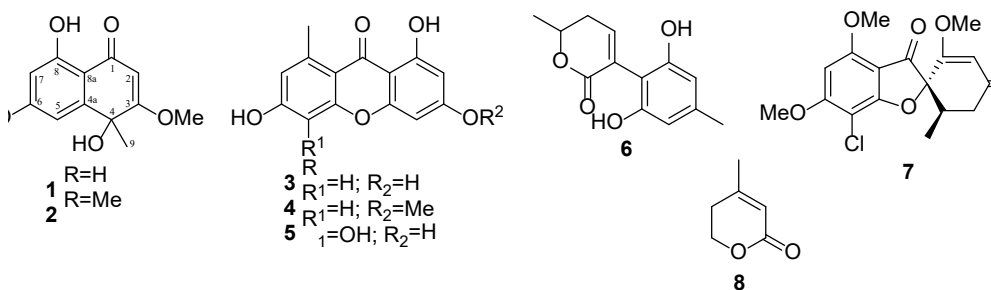
¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия,

электронный адрес: gborkunov@gmail.com

²Дальневосточный федеральный университет, ИНТуПМ, Владивосток, Россия

Известно, что грибы рода *Penicillium* являются одними из самых распространённых микроорганизмов на земле [1]. Эти грибы продуцируют большое количество разнообразных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологической активности, включая антибактериальную [2] и противогрибковую [3], а также микотоксины [4]. В нашем исследовании по поиску продуцентов новых биологически активных веществ мы исследовали грибной штамм *Penicillium raistrickii* КММ 4718, выделенный с абсорбальной поверхности плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, собранного в бухте Троица (зал. Посъет, Японское море).

Из этилацетатного экстракта гриба *P. raistrickii* КММ 4718 при помощи комбинации нормально- и обращено-фазовой хроматографии, включая ВЭЖХ, выделены три новых соединения 1, 2, 6 совместно с известными метаболитами норлихексантоном (3), гризеоксантоном С (4), 1,3,5,6-тетрагидрокси-8-метилксантоном (5), гризеофульвином (7) и δ -лактон 2,3-ангидромевалоновой кислотой (8) (см. рисунок).



Химические структуры метаболитов *Penicillium raistrickii*

Химические структуры выделенных соединений (1–8) были установлены при помощи одно- и двумерной ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением.

Исследована цитотоксическая и антимикробная активность выделенных соединений, а также их влияние на активность фермента уреазы. Все соединения были нетоксичны или слаботоксичны для клеток гепатокарциномы HepG2 и кардиомиоцитов H9c2. Вещества 3, 7 и 8 ингибировали активность фермента уреазы на 50 % при концентрации 15,3, 10,1 и 11,4 мкМ соответственно. Соединение 3 также оказывало существенное влияние на рост тест-культур *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

Список использованных источников

1. Hawksworth, D.L. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 million species / D.L. Hawksworth, R. Lücking // *Microbiology spectrum*. – 2017. – Vol. 5, № 4.
2. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma / E.M.F. Lucas, M.C.N. Castro, J.A. Takahashi // *Brazilian J. Microbiol.* – 2007. – Vol. 38. – P. 785–789.
3. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens* / R. Nicoletti [et al.] // *Mycopathologia*. – 2007. – Vol. 163. – P. 295–301.
4. Frisvad, J. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins / J. Frisvad, R.A. Samson // *Studies in mycology*. – 2004. – Vol. 49. – P. 1–173.

Продукция D-изомера молочной кислоты молочнокислыми бактериями рода *Lactobacillus*

Буко А.И., Сафонова М.Е., Денисенко В.В., Головнева Н.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by*

Одной из приоритетных задач современной биотехнологии является создание экологически безопасных биоразлагаемых полимерных материалов. Природные и синтетические полимеры, получаемые на основе мономеров из возобновляемого сырья, составляют основу эффективных, биосовместимых, биоутилизируемых пластмасс, которые постепенно заменяют существующие в настоящее время полимеры из углеводородного сырья, поскольку становятся конкурентоспособными по цене и характеристикам. Полилактид или поли(молочная кислота) (PLA) является лидером на развивающемся рынке биопластиков, характеризуется доступностью сырьевой базы для получения мономеров – молочной кислоты, относительно небольшими затратами на его производство. PLA – биоразлагаемый, термопластичный, компостируемый полиэфир, для синтеза которого используется преимущественно L-молочная кислота. Однако установлено, что добавление до 10 % D-изомера молочной кислоты для полимеризации приводит к существенному улучшению механических показателей полимера. Уникальные свойства стереокомплексов поли(L-лактид)а с поли(D-лактид)ом значительно увеличили интерес к промышленному производству D-молочной кислоты [1, 2].

Целью работы явилось исследование закономерностей продукции D-изомера молочной кислоты при периодическом культивировании молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*.

Объектами исследований служили молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, выделенные ранее из природных источников. Культивирование бактерий осуществляли в течение 48 ч в жидкой питательной среде MRS с глюкозой (2 %) или мелассой (5 %) в качестве источников углерода, в термостате при 30°C. Для определения L- и D-молочной кислоты использовались наборы ЛАКТАТ-ВИТАЛ АО «Витал Девелопмент Корпорейшн» (РФ) и D-lactic acid/D-lactate colorimetric assay kit (Elabscience, США) соответственно.

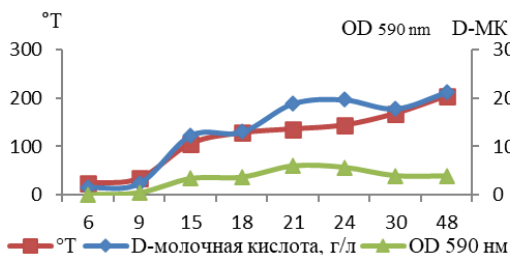
Исследована продукция D-молочной кислоты в процессе роста бактерий. При периодическом культивировании к 24–48 ч накопление D-молочной кислоты на среде с глюкозой у *L. plantarum* 9 составляет 13,7–15,0 г/л, у *L. plantarum* 16 – 10,8–15,2, у *L. paraplantarum* КП – 14,5–21,1 г/л (см. таблицу).

Накопление D-молочной кислоты (г/л) в динамике роста молочнокислых бактерий

Источник углерода в среде	<i>L. plantarum</i> 9			<i>L. plantarum</i> 16			<i>L. paraplantarum</i> КП		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Глюкоза 2 %	14,98	13,71	13,77	10,75	13,78	15,17	15,08	21,13	14,49
Меласса 5 %	14,05	17,63	22,26	14,33	20,48	21,92	15,44	14,28	19,95

На основании сравнительного анализа показателей роста и кислотообразования молочнокислых бактерий для дальнейшего исследования отобран штамм *L. paraplantarum* КП, характеризующийся наиболее высокой скоростью роста и уровнем накопления D-изомера молочной кислоты, способностью ферментировать глюкозу, сахарозу, лактозу и мелассу.

Исследованы динамика роста, кислотообразования и накопления D-молочной кислоты в периодической культуре *L. paraplantarum* КП в зависимости от температуры и содержания глюкозы в питательной среде.



Динамика роста и кислотообразования *L. paraplantarum* КП при культивировании на среде с 4 % глюкозы, 30 °C

Показано более интенсивное накопление D-изомера молочной кислоты к 24 ч роста бактерий на среде с 4 % глюкозы при 30 °C.

Проведенные исследования показали, что отобранные штаммы лактобацилл способны ферментировать глюкозу, сахарозу, лактозу и мелассу с образованием D-молочной кислоты. Для оптимизации условий ферментации и разработки основ технологии получения D-молочной кислоты проведен сравнительный анализ кислотообразования и накопления биомассы в динамике роста бактерий. Установлено, что показатели pH, титруемой кислотности и оптической плотности культур сопоставимы при выращивании бактерий в средах с разными источниками углерода.

Список использованных источников

1. Recent progress in enhancing poly(lactic acid) stereocomplex formation for material property improvement / F. Luo [et al.] // Front. Chem. – 2020. – Vol. 8, № 688. – P. 190–198.
2. Engineered biosynthesis of biodegradable polymers / P. Jambunathan, K. Zhang // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2016. – Vol. 43, № 8. – P. 1037–1058.

Классификатор бактериальных транскрипционных факторов

Вычик П.В.¹, Дигрис А.В.², Дувалов Е.И.², Скакун В.В.², Николайчик Е.А.¹

¹*Биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, Беларусь,*

электронный адрес: p.vuchik@gmail.com

²*Факультет радиофизики и компьютерных технологий,
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Транскрипционные факторы (ТФ) представляют собой белки, имеющие в своем составе один или несколько ДНК-связывающих доменов. Связываясь с регуляторными последовательностями ДНК, ТФ осуществляют глобальный или локальный контроль активности транскрипции генов, обеспечивая переключение клеточного метаболизма в ответ на изменения условий среды. В бактериальных геномах транскрипционная регуляция обеспечивает контроль подвижности клетки, синтеза ферментов для ассимиляции питательных субстратов, экспрессию факторов вирулентности, механизмы кворума и др.

Важность реконструкции регуляторных сетей перечисленных процессов в бактериальных геномах в контексте фундаментальных и прикладных задач биотехнологии требует использования инструментов, позволяющих выявлять в геномах последовательности, кодирующие ТФ. Существующие инструменты для идентификации и классификации ТФ, предлагаемые в виде локальных программ (DeepTFactor, TFpredict) [1, 2] либо веб-сервиса (P2TF) [3], не лишены неудобств – приложения требуют локальной установки на устройствах пользователя, а P2TF не предлагает возможности обработки пользовательских геномных файлов.

Созданный нами классификатор транскрипционных факторов основан на коллекции 99 скрытых марковских моделей ДНК-связывающих доменов из баз данных PFAM [4], SMART [5], TIGRFAMs [6] и 16 моделей, созданных в ходе собственных научных исследований. Классификатор способен идентифицировать большинство известных бактериальных ТФ и определить их принадлежность к конкретным семействам. Сравнение с имеющими аналогичный функционал ресурсами показывает большую чувствительность разработанного классификатора. Так, для наиболее изученного модельного организма *E. coli* известный ресурс P2TF определяет 273 транскрипционных фактора, тогда как наш классификатор – 301. Достоинством разработанного нами классификатора является его доступность в виде веб-сервиса, позволяющего пользователю работать с любыми бактериальными геномами в формате GenBank без локальной установки программ. Классификатор дает возможность полу-

читать последовательность критичных аминокислотных остатков, которая определяет предполагаемый мотив последовательности регуляторной ДНК среди депонированных в базе данных BacRegDB для последующего поиска сайтов связывания. На рисунке представлен пример результата классификации транскрипционных факторов в геноме *E. coli* MG1655. Веб-ресурс для классификации ТФ доступен для использования по адресу: <http://bacregdb.bsu.by/tools>.

TFs encoded in the e-coli-k12.gb								
Protein ID	Gene	Locus Tag	Critical Residue Tag	Family	Accession	E-value	Score	Description
NP_414561.1	nhaR	b0020	VVTPQTTGR	HTH_1	PF00126.25	7e-18	57.1	DNA-binding transcriptional activator NhaR
NP_414576.4	caiF	b0034	-	CaiF_GrlA	PF07180.14	7.4e-09	28.4	DNA-binding transcriptional activator CaiF
NP_414606.1	araC	b0064	SSRSHQLYSR	HTH_18	PF12833.8	3.5e-22	71.2	DNA-binding transcriptional dual regulator AraC
NP_414611.1	sgrR	b0069	-	SgrR_N	PF12793.9	8.1e-44	141.3	DNA-binding transcriptional dual regulator SgrR
NP_414618.4	leuO	b0076	ITSQPASNR	HTH_1	PF00126.25	2.7e-20	64.8	DNA-binding transcriptional dual regulator LeuO
NP_414622.1	cra	b0080	Indel within CR-tag region	HTH_LacI	SM00354	4.8e-27	86.4	DNA-binding transcriptional dual regulator Cra
NP_414623.1	mraZ	b0081	-	MraZ	PF02381.20	3.5e-28	90.1	DNA-binding transcriptional repressor MraZ
NP_414655.1	pdhR	b0113	ERSRPSRQGG	GntR	PF00392.19	8.9e-28	88.5	DNA-binding transcriptional dual regulator PdhR
NP_414688.1	sfsA	b0146	-	SfsA	PF03749.15	3.5e-53	171.8	putative DNA-binding transcriptional regulator

Total TF count: 301 [Download as TSV file](#)

Пример результатов работы классификатора ТФ с геномом *E. coli* MG1655

Список использованных источников

1. DeepTFactor: A deep learning-based tool for the prediction of transcription factors / G.B. Kim [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2021. – Vol. 118, № 2. – P. e2021171118.
2. TFpredict and SABINE: Sequence-Based Prediction of Structural and Functional Characteristics of Transcription Factors / J. Eichner [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e82238.
3. P2TF: a comprehensive resource for analysis of prokaryotic transcription factors / P. Ortet [et al.] // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 628.
4. Pfam: The protein families database in 2021 / J. Mistry [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49, № D1. – P. D412–D419.
5. Letunic, I. SMART: recent updates, new developments and status in 2020 / I. Letunic, S. Khedkar, P. Bork // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49, № D1. – P. D458–D460.
6. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins / D.H. Haft [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29, № 1. – P. 41–43.

Разработка метода выделения полисахаридов молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus*

Гапонова И. И., Щетко В.А., Романова Л.В., Макаревич О.В.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by*

Подходы к выделению полисахаридов из культуральной жидкости варьируют в зависимости от многих факторов, таких как фенотип микроорганизма, состав питательных сред, условия культивирования, структурная характеристика, необходимая степень очистки конечного продукта и др. Выбор оптимального способа выделения полисахаридов позволяет получить их максимальный выход, снизить энерго- и времязатратность [1].

Цель работы – разработка метода выделения из культуральной жидкости полисахаридов молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В 461 Г.

Выделяли полисахариды из 24-часовой культуры *L. helveticus* БИМ В 461 Г, выращенной на среде с сухим обезжиренным молоком. Количество полисахаридов измеряли фенол-серноокислым методом на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 480 нм [2].

На питательных средах с молоком и молочными сыворотками важным этапом является очистка от загрязняющих молочных белков. При изучении литературных данных по выделению полисахаридов отмечено, что некоторые исследователи получают полисахариды путем последовательного пересаживания этанолом, высушивают, затем, используя колоночную хроматографию, отделяют полисахариды от белков и других посторонних примесей [3]. Однако данный способ довольно длительный по времени и не позволяет получить полисахариды в большом объеме.

Проведена оптимизация описанного в литературе [4] метода осаждения полисахаридов. На первом этапе отделяли биомассу клеток путем центрифугирования (7000 g, 25 мин, 4 °С). Затем осаждали белок в супернатанте добавлением в него 5%-й трихлоруксусной кислоты, выдерживали при температуре 4 °С в течение 2 ч и снова центрифугировали, рН супернатанта доводили до 7,0 с помощью раствора NaOH. К надосадочной жидкости добавляли 3 объема ледяного этанола и выдерживали при температуре 4 °С в течение 20 ч. Затем снова центрифугировали, пересаживание осадка полисахаридов этанолом повторяли дважды. В результате осаждались полисахариды, которые подвергали диализу (размер пор 1000 Да) против дистиллированной воды в течение 24 ч. После этого образец лиофильно высушивали (см. рисунок). Полученный препарат полисахаридов, представлял собой порошок белого или светло-кремового цвета без запаха со следовым количеством белка.

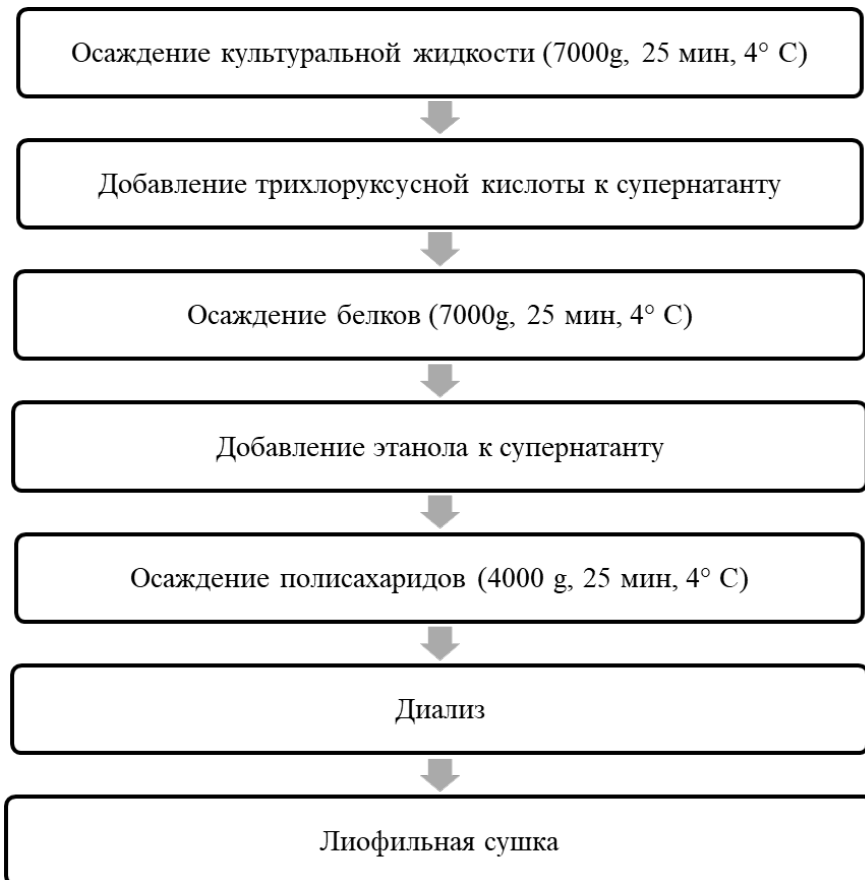


Схема выделения полисахаридов из культуральной жидкости молочнокислых бактерий *L.helveticus* БИМ В 461 Г

Список использованных источников

1. Ruas-Madiedo, P. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria / P. Ruas-Madiedo, C.G. de los Reyes-Gavilarn // J. Dairy Sci. – 2005. – Vol. 88. – P. 843–856.
2. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois [et al.] // Analyt. Chem. – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.
3. Фокина, Н.А. Выделение, характеристика экзополисахаридов молочнокислых бактерий и перспективы их применения : дис. ... канд. с.-х. наук : 1.5.6. / Н.А. Фокина. – Саратов, 2021. – 112 л.
4. Cerning, J. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* / J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud // Biotechnology Letters. – 1988. – Vol. 10. – P. 255–260.

Сравнительная характеристика литической активности бактериофагов *Lactococcus lactis*, выделенных из природных и производственных мест обитания

Герасимович А.Д., Сидоренко А.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: alexandra_88@tut.by

Бактериофаги *Lactococcus lactis*, лизируя заквасочные культуры лактококков, наносят существенный ущерб молочной промышленности. Молокоперерабатывающие предприятия используют разнообразные стратегии борьбы с бактериофаговой инфекцией, однако предпринимаемые меры не всегда эффективны ввиду способности вирусов быстро адаптироваться к неблагоприятным условиям [1]. Сравнительная характеристика литической активности бактериофагов лактококков, выделенных из природных источников и обитающих на предприятиях молочной промышленности, будет способствовать углублению знаний о механизмах адаптации фагов к производственным условиям и разработке эффективных подходов к контролю их численности на предприятиях молочной промышленности.

Объектами исследования служили вирулентные с2-подобные фаги, выделенные из продуктов домашнего приготовления (Lc-2, Lc-3, Lc-4, Lc-5, C2-M25, C2-Tcm), а также фаги групп с2 (Lc-1, RLf-1, RLf-2) и 936 (Skun-Bk, Sk-P1, Sk-C1), изолированные из образцов сырного рассола и продуктов промышленного производства. Фаголизаты с высоким титром получали в жидкой среде MPC (M369-500G, HiMedia), содержащей 10 мМ CaCl₂. Исследование одиночного цикла размножения и спектра литического действия фагов осуществляли общепринятыми методами [2]. Тест-объектами при оценке спектра литического действия служили 30 штаммов *L. lactis* из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Определение генов, детерминирующих биосинтез полисахаридов клеточной стенки лактококков, проводили с помощью мультиплексной ПЦР [3]. Эксперименты выполняли в трехкратной повторности. Статистический анализ осуществляли, используя пакет программ Microsoft Excel.

Исследование литического цикла бактериофагов, выделенных из продуктов домашнего и промышленного производства, показало, что общее время лизиса тест-культур *L. lactis* варьирует от 70 до 140 мин, продолжительность латентного периода составляет 23–43,3 мин, а средний выход фага достигает 69–98 БОЕ/клетку. Бактериофаги, обитающие на предприятиях молочной промышленности, имели более короткий латентный период (23–39 мин) и общее время лизиса (70–120 мин), тогда как средний выход фага был сравнительно

одинаковым. Кроме того, фаги группы с2 характеризовались более высокой литической активностью по сравнению с 936-подобными фагами (продолжительность латентного периода 23–35 мин и 36,9–39 мин, средний выход фага 81–98 БОЕ/клетку и 69–81 БОЕ/клетку, соответственно).

Исследуемые бактериофаги являлись активными в отношении 20–83 % тест-культур *L. lactis*. При этом спектр литического действия с2-подобных фагов, циркулирующих на предприятиях молочной промышленности, был значительно шире (43–83 % тест-культур) по сравнению с фагами этой же группы, выделенными из природных источников (37–50 % тест-культур), и фагами группы 936, обитающими в производственных условиях (20–53 % тест-культур).

Согласно литературным данным, взаимодействие лактококков с бактериофагами конкретной группы зависит от наличия определенных полисахаридов в составе клеточной стенки [4]. В данном исследовании все с2-подобные фаги инфицировали культуры *L. lactis*, в геноме которых выявлены детерминанты, кодирующие полисахариды клеточной стенки типа А, В и С, а фаги Lc-2, Lc-4, Lc-5, RLf-1 и RLf-2 – также неидентифицированный тип полисахаридов (тип U). Среди 936-подобных фагов только Sk-P1 был активен в отношении лактококков, имеющих генетические детерминанты полисахаридов типа А, В, С и U. Бактериофаг Sk-C1 лизировал штаммы, содержащие детерминанты полисахаридов типа В и U, а Skun-Bk – типа А и В.

Полученные результаты свидетельствуют, что бактериофаги группы с2, циркулирующие на предприятиях молочной промышленности, обладают более высокой литической активностью и широким спектром литического действия в сравнении с с2-подобными фагами, выделенными из природных источников, а также 936-подобными фагами, обитающими в производственных условиях. Бактериофаги Sk-P1 (группа 936) и RLf-1 (группа с2), обладающие наибольшей литической активностью и спектром литического действия, могут быть использованы для тестирования фагоустойчивости заквасочных культур лактококков.

Список использованных источников

1. Pujato, S.A. Bacteriophages on dairy foods / S.A. Pujato, A. Quiberoni, D.J. Mercanti // J. Appl. Microbiol. – 2018. – Vol. 126, Iss. 1. – P. 14–30.
2. Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes / J. Mahony [et al.] // Virology. – 2012. – Vol. 434, Iss. 2. – P. 143–150.
3. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures / J. Oliveira [et al.] // J. Dairy Sci. – 2018. – Vol. 101, Iss. 1. – P. 96–105.
4. Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity / S. Ainsworth [et al.] // mBio. – 2014. – Vol. 5, Iss. 3.

Создание химерной конструкции, кодирующей онконазы, слитую с белком-партнером Sumo

Дайнеко А.В.^{1,2}, Чиндарева М.А.¹, Зинченко А.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: daineko1999@list.ru

²Университет НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Онконаза, также известная как ранпирназа, представляет собой рибонуклеазу, выделенную из ооцитов или эмбрионов на ранней стадии развития Северной леопардовой лягушки (*Rana pipiens*). Рибонуклеаза амфибий обладает как противоопухолевыми, так и противовирусными свойствами [1].

Онконаза доказала свою клиническую эффективность в лечении карциномы легкого и злокачественной мезотелиомы с минимальными побочными эффектами [2]. Противовирусные свойства рибонуклеазы подтверждает ее активность по отношению к некоторым представителям двухцепочечных ДНК-вирусов, ретровирусов и одноцепочечных РНК-вирусов [3].

Ранпирназа относится к суперсемейству РНКаз А и на 30 % идентична по аминокислотной последовательности гомологичному белку – бычьей панкреатической рибонуклеазе (РНКазы А) [1].

Пандемия, возникшая в 2019 году, обусловлена одноцепочечным (+) РНК-вирусом SARS-CoV-2. Известно, что многие РНКазы выступают как противовирусные агенты. Так, например, РНКазы А в исследованиях *in vitro* способна эффективно разрушать РНК SARS-CoV-2 [4].

В июне 2020 года компания Origene и Leidos (США) начала клиническое испытание онконазы при системном лечении пациентов, страдающих тяжелым острым респираторным синдромом, вызванным SARS-CoV-2 [2]. Однако результаты этого клинического испытания еще не опубликованы. При этом ожидается, что онконаза будет способна подавлять репликацию SARS-CoV-2.

Литературные данные свидетельствуют, что уровень экспрессии рекомбинантной онконазы довольно низкий, поэтому для повышения выхода целевого белка нам представляется целесообразным использовать белок-помощник, в частности Sumo [5], который ранее для этой цели не использовался.

Целью данной работы явилось получение химерной генетической конструкции, несущей ген онконазы и ген, кодирующий белок-помощник Sumo.

Синтез гена на основе аминокислотной последовательности онконазы (база данных UniProt, архивный номер P22069) осуществляла коммерческая фирма «Eurofins» (Германия). Встраивание гена онконазы в вектор pJet 1.2 проводили методом лигирования по сайту *EcoRV*. Полученную генетическую конструкцию pJet-Оnc трансформировали в клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue. После

осуществления ПЦР-скрининга клонов-трансформантов на наличие целевого гена визуализировали на электрофореграмме чистый продукт с ориентировочным размером 350 пар оснований (п. о.), что соответствует размеру гена онконазы.

На следующем этапе осуществляли встраивание полученного гена в линейаризованную плазмиду pET-42a (+), содержащую ген белка-помощника Sumo. Сборку химерной генетической конструкции осуществляли методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР). Полученной ПЦР-смесью (pET-42-Sumo-Onс) трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) с помощью электропорации. Размер амплификатов после ПЦР-скрининга трансформантов с праймерами к T7-промотору и T7-терминатору составил около 700 п. о., что соответствует теоретически рассчитанному размеру (ген *sumo* имеет размер 305 п. о. и ген онконазы – 350 п. о.).

Колонии, содержащие генетическую конструкцию, пересеяли на питательную среду с селективным антибиотиком для наработки рекомбинантной онконазы в прокариотической экспрессионной системе.

Список использованных источников

1. Saxena, A. Effect of onconase on double-stranded RNA *in vitro* / A. Saxena, S. Saxena, K. Shogen // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1067–1072.
2. Menegazzi, M. Role of the ribonuclease onconase in miRNA biogenesis and tRNA processing: focus on cancer and viral infections / M. Menegazzi, G. Gotte // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – Art. 6556.
3. Antiviral ranpirnase TMR-001 inhibits rabies virus release and cell-to-cell infection *in vitro* / T.G. Smith [et al.] // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12, № 177. – P. 1–12.
4. Морозов, И.А. Деструктивное действие РНКазы А на вирус SARS-CoV-2 (исследование *in vitro*) / И.А. Морозов, А.П. Годовалов, Д.А. Оборин // *Мед. академ. журн.* – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 131–134.
5. Panavas, T. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems / T. Panavas, C. Sanders, T.R. Butt // *Methods in molecular biology: SUMO protocols* / Helle D. Ulrich. – New York, 2009. – Ch. 20. – P. 303–317.

Стабильность и пути деградации 10-членных лактонов – перспективных грибных фитотоксинов для защиты растений

Далинова А.А., Дубовик В.Р., Федоров А.Н., Радюпов В.Э., Ванюкова Л.А., Алексеева А.Н., Берестецкий А.О.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
Санкт-Петербург, Россия, электронный адрес: adalinova@vizr.spb.ru

Природные соединения являются неиссякаемым источником новых базовых структур для лекарств и пестицидов. Разработка новых препаратов на основе этих веществ подразумевает большой спектр исследований – от способа биотехнологического получения и/или схем синтеза аналогов до создания наиболее эффективных препаративных форм. При этом на всех этапах разработки важно учитывать стабильность перспективных соединений под действием температуры, pH, растворителя и др. Десятичленные лактоны грибов (стагонолид А, стагонолид Н, пинолидоксин, гербарумин I, путаминоксин и др.) рассматриваются как потенциальные гербицидные молекулы для защиты растений [1, 2].

Объектами изучения стабильности являлись стагонолид А и гербарумин I, образуемые грибом *Stagonospora cirsii* [2], а также пинолидоксин, вторичный метаболит патогена гороха *Didymella pinodes* [3]. Оценивали влияние абиотических факторов (различные растворители, pH, температура) на стабильность фитотоксинов. Для оценки содержания веществ в образцах использовали метод количественного анализа при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Вещества закладывали на хранение в сухом виде, в ацетоне, ацетонитриле, 5%-ном водном этаноле, а также в смесях ацетонитрила с водой и различными водными буферами – 0,1%-ной муравьиной кислотой (pH 3) и 0,05%-ным раствором аммиака (pH 9). Подготовленные растворы герметично закрывали и раскладывали на хранение при трех температурах – 24, 4 и –20 °С, каждый вариант в трех повторностях. Стабильность веществ отслеживали в динамике (0, 1, 3, 7, 14, 28 и 60-е сутки хранения).

Для каждого фитотоксина были выявлены условия хранения, в которых он демонстрировал наименьшую стабильность. Стагонолид А с разной скоростью деградировал во всех растворителях при всех температурах. К 60-м суткам при комнатной температуре во всех вариантах хранения в растворах в присутствии воды оставалось не более 10 % исходного фитотоксина, в растворах без воды – не более 40 %. При анализе методом ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (ВЭЖХ-ДМД-МС) в смеси детектировали стагохромен А [1]. Пинолидоксин оказался крайне нестабилен в сухом виде при комнатной температуре, уже через 1 сутки хранения наблюдали снижение его количества на 30–35 %. При помощи ВЭЖХ-ДМД-МС в составе этих

значительно деградировавших образцов пинолидоксина были обнаружены два продукта деградации. Сравнение с физико-химическими характеристиками полусинтетических производных пинолидоксина позволило соотнести эти соединения с 5,6-эпоксидом и окисленным по С-7 продуктом. Родственный по структуре пинолидоксину гербарумин I продемонстрировал схожий профиль стабильности. Деградация гербарумина I в сухом виде при комнатной температуре происходила гораздо медленнее, чем у пинолидоксина – исходного вещества практически не обнаруживали в смеси только к 28-м суткам хранения. Интересно, что в деградировавших образцах был детектирован стагонолид А, а также 5,6-эпоксид гербарумина I, полученный ранее в виде полусинтетического вещества [4].

Таким образом, мы показали, что 10-членные лактоны схожей структуры – гербарумин I и пинолидоксин – демонстрируют аналогичные профили стабильности и однотипные пути деградации – окисляются на воздухе по положению С-7 с образованием α,β -ненасыщенного кетона и по С-5-С-6 двойной связи с образованием эпоксидов. Стагонолид А, по-видимому, благодаря своей α,β -ненасыщенной кето-группе, способен претерпевать перегруппировку с образованием стагохромена А. Интересно, что как стагохромен А, так и 5,6-эпоксид гербарумина были описаны ранее как природные соединения [1, 3]. Стагохромен А обнаруживается и в свежих экстрактах из культурального фильтрата *S. cirsii*, однако может являться продуктом неферментативного превращения стагонолида А. Не исключено, что и 5,6-эпоксид пинолидоксина образуется неферментативным путем в культуре *D. pinodes*. Полученные нами данные убедительно демонстрируют, что при работе с биологически активными природными соединениями необходимо определять их стабильность в тех условиях, в которых предполагается проводить исследования. Это позволит повысить воспроизводимость и надежность результатов экспериментов, в том числе по оценке перспективности исследуемых соединений в защите растений и медицине.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-16-00 038.

Список использованных источников

1. Stagonolides J and K and Stagochromene A, two New Natural Substituted Nonenolides and a New Disubstituted Chromene-4,5-Dione Isolated from *Stagonospora cirsii* S-47 Proposed for the Biocontrol of *Sonchus arvensis* / A. Dalinova [et al.] // Agric. Food Chem. – 2019. Vol. 67, № 47. – P. 13040–13050.
2. Dubovik, V. Effect of Adjuvants on Herbicidal Activity and Selectivity of Three Phytotoxins Produced by the Fungus, *Stagonospora cirsii* / V. Dubovik, A. Dalinova, A. Berestetskiy // Plants. – 2020. – Vol. 21/9, № 11. – P. 1621.
3. Pinolidoxin, a phytotoxic nonenolide from *Ascochyta pinodes* / A. Evidente [et al.] // Phytochemistry. – 1993. – Vol. 34, № 4. – P. 999–1003.
4. Structure-Activity Relationship of Phytotoxic Natural 10-Membered Lactones and Their Semisynthetic Derivatives // A. Dalinova [et al.] // J. Fungi. – 2021. – Vol. 7. – P. 829.

Идентификация и биохимическая характеристика термофильных бактерий, синтезирующих молочную кислоту

Долбунова А.Н., Романова М.В., Евдокимова С.А., Суворов Д.А.,
Барашина В.Р., Хромова Н.Ю., Белодед А.В.

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

электронный адрес: romanovamariav@gmail.com

В связи с обострением проблемы загрязнения окружающей среды пластиковыми отходами растёт интерес к производству экологически чистых и биодegradируемых материалов на основе возобновляемого сырья. Так, достойной альтернативой трудноутилизируемым пластмассам является биоразлагаемый полимер молочной кислоты – полилактид [1]. Перспективы применения полилактида весьма широки: производство одноразовой посуды и упаковочных материалов, изготовление медицинских изделий, разработка систем доставки лекарств и даже технологии 3D-печати [2]. Наиболее рациональным способом получения молочной кислоты – предшественника для синтеза лактида и полилактида – является микробиологический синтез. Термофильные микроорганизмы считаются перспективными продуцентами первичных и вторичных метаболитов, поскольку они характеризуются высокой скоростью роста культуры, обладают ускоренным метаболизмом и менее подвержены риску контаминации, чем мезофильные культуры [3]. При разработке технологии получения молочной кислоты с использованием термофильных штаммов ключевым моментом является выбор подходящего источника углерода. Целью данной работы являлась идентификация и биохимическая характеристика термофильных бактерий – потенциальных продуцентов молочной кислоты.

В качестве объекта исследований использовали культуры термофильных бактерий, выделенных из образцов природного происхождения при 50°C в микроаэрофильных условиях. Выделенные штаммы характеризовались палочковидной морфологией и предварительно были отнесены к семейству *Bacillaceae*. По результатам хроматографического анализа среди 15 выделенных термофильных штаммов 12 показали способность синтезировать молочную кислоту в значимых количествах, некоторые культуры продуцировали другие органические кислоты – уксусную и пропионовую. Два штамма Т7.1 и Т8.1 на основе молекулярно-генетического анализа гена 16S рРНК были отнесены к видам *Weizmannia coagulans* и *Bacillus licheniformis* соответственно. Результаты проведенных исследований показали, что штаммы относятся к факультативным анаэробам, обладают способностью сбраживать глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и лактозу в органические кислоты, а также продуцируют внеклеточные амилазы и целлюлазы.

С целью оценки возможности использования альтернативных углеводных источников для биосинтеза лактата методом ВЭЖХ исследовали профиль выделяемых штаммом Т7.1 органических кислот при культивировании на средах с глюкозой, фруктозой, сахарозой и крахмалом. Данные анализа представлены в таблице.

**Синтез органических кислот термофильным штаммом Т7.1
 при культивировании на средах с различными углеводными субстратами**

Источник углерода	Молочная кислота, г/л	Пропионовая кислота, г/л	Уксусная кислота, г/л
Глюкоза	3,29	0,44	Не обнаружена
Фруктоза	1,33	0,21	Не обнаружена
Сахароза	1,11	0,14	Не обнаружена
Крахмал	0,17	Не обнаружена	0,19

В ходе работы были идентифицированы и охарактеризованы термофильные бактерии, синтезирующие молочную кислоту, проанализирована способность перспективного штамма-продуцента молочной кислоты Т7.1 сбраживать различные углеводы с образованием лактата. Дальнейшие исследования будут включать оценку возможности использования гидролизатов растительного сырья, содержащих разнообразные моно- и олигосахариды, для получения молочной кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РХТУ им. Д.И. Менделеева, прикладной научно-исследовательский проект молодых штатных работников РХТУ им. Д.И. Менделеева в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» № ВИГ-2022-040.

Список использованных источников

1. Polymers Based on PLA from Synthesis Using D,L-Lactic Acid (or Racemic Lactide) and Some Biomedical Applications: A Short Review / J.O.C. de França [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14, № 12 (2317). – P. 1–35.
2. Singhvi, M.S. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications / M.S. Singhvi, S.S. Zinjarde, D.V. Gokhale // *Journal of applied microbiology*. – 2019. – Vol. 127, № 6. – P. 1612–1626.
3. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals / B.M. Zeldes [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6, № 1209. – P. 1–17.

Природные 10-членные лактоны: источники, структурное разнообразие, спектр биологической активности и перспективы использования

Дубовик В.Р., Далинова А.А., Берестецкий А.О.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
Санкт-Петербург, Россия, электронный адрес: vdubovik@vizr.spb.ru*

Десятичленные лактоны (ДЧЛ) представляют собой интересную и разнообразную группу природных поликетидов, продуцируемых в основном микромицетами, а также бактериями и другими организмами [1, 2]. Эти соединения способны проявлять широкий спектр биологической активности, включая фитотоксическую, цитотоксическую, антибактериальную и другие. Несмотря на широкое распространение в природе и более чем 60-летнюю историю исследований этих соединений, до сих пор остается много вопросов, связанных с номенклатурой и классификацией их структурного разнообразия. Проведенный анализ литературных источников позволил нам собрать полный список практически всех описанных на сегодня ДЧЛ, который включает в себя 214 веществ. Эта база данных позволила нам в полной мере оценить все структурное разнообразие этих соединений, а также провести анализ их природных источников, выявить наиболее распространенные структурные типы и оценить степень изученности биологической активности.

Большинство всех описанных представителей этой группы соединений (84 %) имеют грибную природу, 9,2 % – бактериального происхождения; 6,3 % от всех ДЧЛ составляют лактоны, выделенные из животных (лягушек, морских ежей и насекомых). Из всего многообразия ДЧЛ только одно соединение было выделено из растений. По структурному разнообразию наиболее распространенной подгруппой являются простые ДЧЛ с алкильной цепью при C-9, содержащей нечетное количество атомов углерода (~69 %).

Анализ собранной информации позволил выявить основные проблемы, которые препятствуют всестороннему изучению ДЧЛ. Во-первых, поиск этих соединений в литературе затруднен по причинам неоднозначной номенклатуры. В публикациях, описывающих природные ДЧЛ, зачастую можно встретить названия «ноненолид» или «нонанолид», а также «деканолид», что не всегда соответствует требованиям ИЮПАК номенклатуры [1, 2]. Термин «10-членные лактоны» наиболее точно отражает структурные особенности этой группы. Разнородность тривиальных названий некоторых ДЧЛ также вызывает трудности при поиске структурно родственных соединений. Во-вторых, отсутствие или неправильное определение видовой принадлежности ор-

ганизма-продуцента ДЧЛ приводит к тупиковой ситуации при необходимости выделить из природного источника конкретный вторичный метаболит. В настоящее время для видовой идентификации микромицетов принято использовать молекулярные методы, в то время как большое количество продуцентов ДЧЛ идентифицировано только по морфологическим признакам. В-третьих, недостаточная изученность биологической активности ДЧЛ не дает возможности определить характерные для них типы активности, а также взаимосвязь структуры и активности. Для более 12 % всех описанных 10-членных лактонов биологическая активность осталась неизученной, 46 % соединений оценивали только на один тип активности. Масштабное исследование биологической активности с привлечением более трех различных биотестов проводилось только для около 25 % всех описанных в литературе ДЧЛ.

Несмотря на эти проблемы, прослеживается прогресс в изучении свойств соединений этой интересной группы. В последнее время активно развиваются современные направления исследований ДЧЛ – биосинтез [3], механизмы действия [4, 5] и способы практического применения [6].

Таким образом, 10-членные лактоны – относительно большая группа природных соединений, которая заслуживает более пристального и детального изучения. Всеобъемлющая информация имеет решающее значение для дальнейшего понимания их экологической роли и практического значения. В ближайшем будущем комплексные исследования ДЧЛ позволят расширить возможные области их применения.

Работа поддержана грантом РНФ 22-16-00 038.

Список использованных источников

1. Decanolides, 10-membered Lactones of Natural Origin / G. Dräger [et al.] // Nat. prod. rep. – 1996. – Vol. 13. – P. 365–375.
2. Nonanolides of Natural Origin: Structure, Synthesis, and Biological Activity / P. Sun [et al.] // Cur. Med. J. Chem. – 2012. – Vol. 19. – P. 3417–3455.
3. Characterization of NRPS and PKS genes involved in the biosynthesis of SMs in *Alternaria dauci* including the phytotoxic polyketide aldaulactone / J. Courtial [et al.] // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12. – P. 8155.
4. Structure-Activity Relationship of Phytotoxic Natural 10-Membered Lactones and Their Semi-synthetic Derivatives / A. Dalinova [et al.] // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7, № 10. – P. 829.
5. Effects of Phytotoxic Nonenolides, Stagonolide A and Herbarumin I, on Physiological and Biochemical Processes in Leaves and Roots of Sensitive Plants / E. Tyutereva [et al.] // Toxins. – 2023. – Vol. 15. – P. 234.
6. Dubovik, V. Effect of Adjuvants on Herbicidal Activity and Selectivity of Three Phytotoxins Produced by the Fungus, *Stagonospora cirsii* / V. Dubovik, A. Dalinova, A. Berestetskiy // Plants. – 2020. – Vol. 9, № 11. – P. 1621.

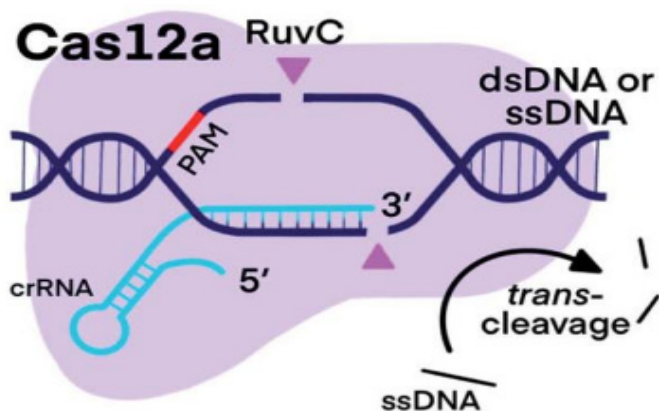
Создание регулируемой системы CRISPR-Cas12a для редактирования генома микобактерий

Дудик П.С.^{1,2}, Армянинова Д.К.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия, электронный адрес: info@fbras.ru

²Институт Агробиотехнологии, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Mycobacterium tuberculosis – опасный патоген, вызывающий туберкулез, представляет собой угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. Это заболевание – основная причина смерти, обусловленная одним возбудителем инфекции. По данным ВОЗ, около одной четверти населения мира инфицированы туберкулезом [2].



Работа системы CRISPR-Cas12a [1]

На сегодняшний день исследователи по всему миру не перестают предпринимать попытки разработать новые подходы редактирования генома микобактерий для изучения функций различных генов и дальнейшей разработки новых лекарственных препаратов [3, 4]. Одним из таких перспективных инструментов является система CRISPR/Cas12a (см. рисунок). Разрыв фосфодиэфирных связей обеих цепей ДНК при действии эндонуклеазы Cas12a, у бактерий рода *Mycobacterium* может восстанавливаться посредством трех основных путей репарации: гомологичная рекомбинация (HR), негомологичное соединение концов (NHEJ), а также одноцепочечный отжиг (SSA) [5]. Имеются литературные данные, которые указывают на то, что активация каждого из путей происходит на разных этапах жизненного цикла клетки [5]. Поскольку, к примеру, вставка в геном новых последовательностей реализуется путем HR,

а удаление гена путем NHEJ или SSA, то для эффективного решения различных задач редактирования необходимо создать удобную регулируемую систему редактирования.

В связи с этим для редактирования клеток рода *Mycobacterium* были созданы несколько вариантов одноплазмидной CRISPR/Cas12a-системы с различными вариантами регуляции ее работы. В данной работе мы произвели характеристику индуцируемого тетрациклином промотора $P_{\text{mycl}} \text{tetO}$, а также изучили наличие зависимости уровня транскрипции гена *Cas12a* от различных факторов: типа индуктора, дозы индуктора и времени индукции.

Список использованных источников

1. CRISPR technology incorporating amplification strategies: molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules / W. Feng [et al.] // Chem. Sci. – 2021. – Vol. 12, № 13. – P. 4683–4698.
2. Global Tuberculosis Report 2021 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>. – Date of access: 14.10.2021.
3. Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor / S. Ehrh [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33, № 2. – P. e21–e21.
4. Williams, K.J. Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors / K.J. Williams, G. Joyce, B.D. Robertson // Plasmid. – 2010. – Vol. 64, № 2. – P. 69–73.
5. A crispr-assisted nonhomologous end-joining strategy for efficient genome editing in *Mycobacterium tuberculosis* / M.Y. Yan [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11, № 1.

Контролируемый биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12

Дудун А.А.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия, электронный адрес: dudunandrey@mail.ru

Использование альгинатов и поли-3-оксибутирата (ПОБ) бактериального происхождения привлекает все большее внимание исследователей, работающих в области медицины и тканевой инженерии [1]. Важными особенностями альгината и ПОБ является их способность к биоразложению и их биосовместимость [2]. К одновременному синтезу альгинатов и ПОБ способны некоторые виды бактерий рода *Azotobacter* sp. Особенностью бактерий *Azotobacter* sp. является не только одновременный синтез двух биополимеров, но и возможность регулирования процесса их синтеза.

В данной работе были синтезированы альгинат и ПОБ методом полного факторного эксперимента (ПФЭ) бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12. Для постановки ПФЭ были выбраны три фактора (2^3): концентрация сахарозы, концентрация фосфатов и уровень аэрации в ростовой среде. Биополимеры были выделены из культуральной жидкости (свободный альгинат) и клеточной биомассы (капсулярный альгинат и ПОБ).

Оценка динамики роста бактерий (рис. 1, а) в условиях низкой (O-) и высокой аэрации (O+) показала, что клетки более активно растут при высоких концентрациях молекулярного кислорода. Результаты общего выхода полимеров демонстрируют, что за счет ограничения главного источника углерода и достижения высокой концентрации фосфатов и высокого уровня аэрации можно изолированно синтезировать капсулярный альгинат (рис. 1, б).

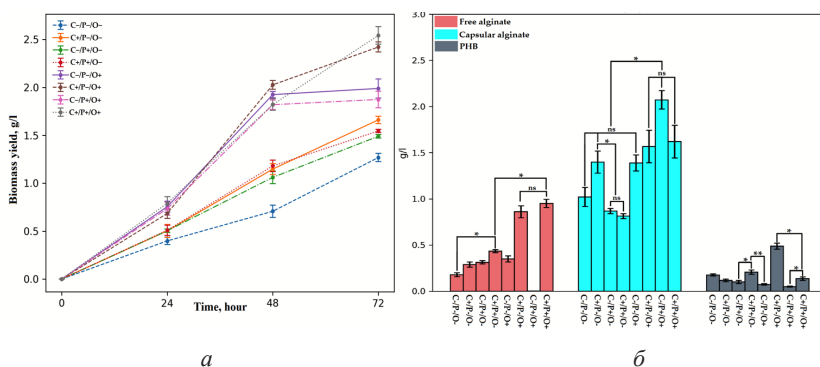


Рис. 1. Динамика роста бактерий *A. vinelandii* 12 в ПФЭ (а). Синтез биополимеров в ПФЭ 2^3 (б)

Обнаружены большие различия по молекулярным массам (M_r) между свободными и капсулярными альгинатами: свободные альгинаты во всех опытах имели массу в районе 100–110 кДа, в тоже время капсулярный значительно различался между разными опытами в ПФЭ, но имел более высокую M_r сравнительно со свободным альгинатом.

Для изучения реологических свойств капсулярных альгинатов по результатам M_r были отобраны альгинаты с наименьшей и наибольшей M_r . В качестве контроля был выбран коммерческий альгинат водорослей со средней M_r 120–180 кДа. Капсулярный альгинат с высокой молекулярной массой формирует гидрогели наивысшей плотности (рис. 2, а).

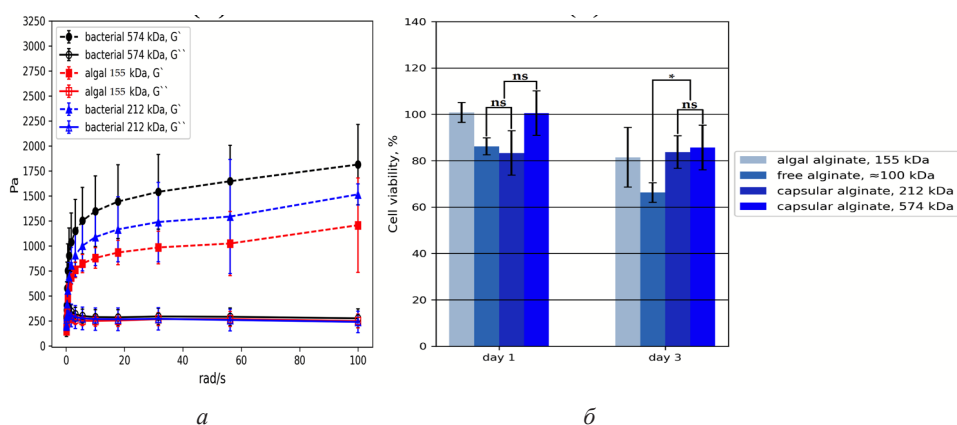


Рис. 2. Частотные измерения вязкоупругости альгинатных гидрогелей (а).
Оценка цитотоксичности альгинатов (б)

Водорослевый и бактериальные альгинаты не проявляли цитотоксичности к мезенхимальным стволовым клеткам (МСК) через 24 ч. На третьи сутки роста клеток все альгинаты проявляли незначительную токсичность, за исключением свободного альгината, в котором количество жизнеспособных МСК оказалось менее 70 % (рис. 2, б).

Полученные результаты показывают, что за счет регулирования условий культивирования можно получать альгинаты и ПОБ с различными физико-химическими характеристиками для определенных биотехнологических и биомедицинских задач.

Список использованных источников

1. Engineering alginate as biolink for bioprinting / J. Jia [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2014. – Vol. 10, № 10. – P. 4323–4331.
2. In situ gelling xyloglucan/alginate liquid formulation for oral sustained drug delivery to dysphagic patients / K. Itoh [et al.] // Drug. Del. Ind. Pharm. – 2010. – Vol. 36, № 4. – P. 449–455.

Получение флуоресцентно меченного штамма бактерий *Bacillus altitudinis* 11-1-1-GFP

Евдокимова О.В., Муратова А.А., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: evdokimovalesia@gmail.com*

Для изучения механизма патогенеза фитопатогенных бактерий важную роль играет визуализация процесса распространения бактерий в инфицированных органах растения и взаимодействия патогена с тканями хозяина на клеточном уровне. Одним из способов решения данной задачи является маркирование штаммов путем направленного биосинтеза флуоресцентных белков в их клетках [1]. Особый интерес представляют бактерии, отдельные штаммы которых являются факультативными патогенами и способны спорадически вызывать бактериозы растений. Таким объектом исследования является штамм *Bacillus altitudinis* 11-1-1, выделенный из поврежденной ткани растения картофеля [2], для которого остается невыясненным механизм патогенеза.

Цель работы – получение производного штамма *B. altitudinis* 11-1-1, меченого зеленым флуоресцентным белком superfolder GFP, и оценка возможности применения штамма *in vivo*.

Природные изоляты бактерий рода *Bacillus*, как правило, трудно поддаются генетической модификации. Методы трансформации, описанные для коммерческих и модельных штаммов бацилл, оказываются низкоэффективными или безуспешными для «диких» штаммов [3]. Для введения векторных плазмид в клетки бактерий *B. altitudinis* 11-1-1 были применены несколько методик трансформации, включая основанную на естественной компетентности, механическую сепиолитную, химическую с тепловым шоком, трансформацию протопластов, электропорацию в различных модификациях. Среди протестированных методов результативным для *B. altitudinis* 11-1-1 оказался оптимизированный протокол трансформации *Bacillus pumilus* [4] с модификацией увеличения времени совместной инкубации компетентных клеток и донорской ДНК перед электропорацией до 30–40 мин, как показано в работе [3]. Эффективность трансформации адаптированным методом достаточно низкая (около 100 КОЕ/мкг ДНК), и подтвердить наследование введенной ДНК в клетки *B. altitudinis* 11-1-1 удалось только для плазмиды pBC16. Природная плазида бактерий рода *Bacillus* pBC16 имеет ограниченное число сайтов рестрикции и содержит только бациллярный ориджин репликации, что затрудняет создание вектора с экспрессионной кассетой на ее основе.

Для создания целевой конструкции был получен гибридный бинарный вектор pJET::BC16 путем вставки в коммерческую плазмиду pJET1.2 амплифи-

цированного фрагмента pBC16, при этом селекция трансформированных бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue осуществлялась на ампициллине (100 мкг/мл), а бацилл – на тетрациклине (25 мкг/мл). Введение рекомбинантной плазмиды в клетки *B. altitudinis* 11-1-1, подтвержденное ПЦР со штаммоспецифическими праймерами и праймерами к целевой плазмиде, доказало возможность трансформации штамма плазмидами с отличающимся типом метилирования, в том числе размноженными в грамотрицательных бактериях.

В гибридный вектор pJET::BC16 была осуществлена вставка экспрессионной кассеты, несущей ген флуоресцентного белка superfolder GFP под контролем промотора P_{serA(PSI)}. Полученную векторную конструкцию вводили в клетки *B. altitudinis* 11-1-1 оптимизированным методом электропорации. Выросшие на селективной среде колонии *B. altitudinis* 11-1-1-GFP имели зеленую окраску и флуоресцировали при освещении синим светом. При инокуляции клубней картофеля суспензией клеток исходного штамма *B. altitudinis* 11-1-1 и его производного, содержащего pJET::BC16::sfgfp, наблюдали появление влажной распространяющейся гнили светло-коричневого цвета, сопоставимой по размеру и характеру повреждения для обоих вариантов. При освещении срезов клубней синим светом наблюдали флуоресценцию мацерированной растительной ткани, распространяющуюся на некоторое расстояние от места введения бактериальной суспензии меченого штамма, что говорит о поддержании вектора в клетках бактерий в отсутствие селективной нагрузки.

Таким образом, в результате работы с помощью оптимизированного метода электропорации получен флуоресцентно меченый штамм *B. altitudinis* 11-1-1-GFP. Показана возможность применения данного штамма для наблюдения за развитием бактериальной популяции в растительной ткани.

Список использованных источников

1. Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv / K. Wang [et al.] // *New Phytol.* – 2007. – Vol. 174, № 1. – P. 212–223.
2. Evdokimova, O.V. Genomic analysis of *Bacillus pumilus* phytopathogenic strain 11-1-1 / O.V. Evdokimova, E.A. Semenchukova, L.N. Valentovich // 2nd Internat. Scientific Conf. “Plants and Microbes: the Future of Biotechnology”. – 2020. – P. 66.
3. Optimization of Electroporation Conditions for *Bacillus pumilus* 3-19 Strain / I.V. Danilova [et al.] // *BioNanoScience.* – 2022. – Vol. 12, № 3. – P. 752–756.
4. Development of a high-efficient transformation system of *Bacillus pumilus* strain DX01 to facilitate gene isolation via gfp-tagged insertional mutagenesis and visualize bacterial colonization of rice roots / X. Shen [et al.] // *Folia Microbiol. (Praha).* – 2013. – Vol. 58, № 5. – P. 409–417.

Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата, природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646 и исследование свойств полученных полимеров

Жила Н.О.^{1,2}, Сапожникова К.Ю.^{1,2}, Волова Т.Г.^{1,2}

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия,
электронный адрес: nzhila@mail.ru

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – активно изучаемые разрушаемые био-полимеры, синтезируемые различными микроорганизмами, рассматриваются в качестве перспективы для замены синтетических не разрушаемых пластиков, получаемых из нефти, накопление которых в биосфере является глобальной экологической проблемой.

К необычным и малоисследованным типам ПГА относятся трехкомпонентные сополимеры, содержащие в качестве мономеров, помимо 3-гидроксипирватата (ЗГБ), единицы 3-гидроксивалерата (ЗГВ) и 4-гидроксивалерата (4ГВ). Особенностью этих представителей семейства ПГА являются более низкие температуры стеклования и плавления, а также более низкая степень кристалличности.

Цель работы – изучение условий накопления ПГА, содержащих мономеры 4ГВ и ЗГВ, природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10 646; синтез семейства сополимеров с различным соотношением мономеров ЗГВ и 4ГВ и изучение их физико-химических свойств.

Исследованы закономерности синтеза сополимеров П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4НВ) природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10 646 на фруктозе или масляной кислоте в качестве основного С-субстрата с добавками γ -валеролактона в качестве предшественника мономеров ЗГВ и 4ГВ. Определены условия контролируемого дозирования γ -валеролактона для нелимитированного роста бактерий и синтеза полимеров. Реализованы режимы ферментации, позволившие синтезировать образцы сополимеров с различным соотношением мономеров ЗГВ и 4ГВ, при сохранении высоких показателей концентрации биомассы бактерий и содержания полимера. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, дифференциального термического анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии, а также рентгеноструктурного анализа установлено, как включения в состав ПГА мономеров ЗГВ и 4ГВ влияют на молекулярно-массовые и температурные характеристики синтезированных сополимеров и степень кристалличности. Получен важный результат влияния мономеров ЗГВ и 4ГВ на свойства ПГА, заключающийся в значительном снижении степени кристалличности (до 36–47 %) синтезированных полимерных

образцов. Снижение степени кристалличности образцов ПГА положительно влияет на их свойства и кинетику кристаллизации, облегчает переработку в специализированные изделия, улучшая технологические свойства.

Исследованы свойства поверхности пленок различного состава, которые включали применение сканирующей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии для регистрации шероховатости и показателей пористости (количество и размеры пор, общая площадь пор относительно площади пленок). Все показатели несколько варьировали у пленок, полученных из сополимеров с различным включением 3ГВ и 4ГВ; при этом прямо не зависели от соотношения мономеров в полимере. Полученные результаты позволяют масштабировать продуктивный синтез сополимеров П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-4НВ) в культуре природного штамма *Cupriavidus necator* В-10 646, организовать получение партий образцов этого типа разрушаемых ПГА для переработки в полимерные изделия.

Свойства вклеточной холестеролоксидазы *Paenarthrobacter aureus*

Жуковская Л.А., Семашко Т.В., Судакова Е.С.

Інстытут мікробіалогіі НАН Беларусі, Мінск, Беларусь
электронны адрас: mila_zhu@mail.ru

Холестеролоксидаза (ХО) (КФ 1.1.3.6.) – мономерны бифункцыянальны флавінадениндинуклеотид (ФАД), змяшчаючы фермент, прыналежаючы да класа аксідорэдуктаз і каталізуецца акісленне і ізамерызацыю холестеріна з утварэннем пераксіда вадарода [1].

ХО прымяняецца для вызначэння холестеріна ў ежовых і біялагічных зразках, можа выкарыстоўвацца ў якасці каталізатара ў біааконверсіі стэроідных злучэнняў і як інсектыцыднае сродства [1, 2].

Ісследванне фізіка-хімічных свайстваў ферментаў з'яўляецца неабходным умовам іх эфектыўнага прымянення ў далейшым. Вядома, што большасць мікробных ХО маюць аптымальныя значэнні пры рН 7,0–7,5, а дыяпазон значэнняў рН-стабільнасці складае 5,0–8,5. Што датычыцца значэнняў тэмпературнага оптымума і тэрмастабільнасці, то яны знаходзяцца ў дыяпазоне ад 35 да 70 °С [3, 4].

Целью данага ісследвання было вывучэнне асноўных каталітычных свайстваў ХО *Paenarthrobacter aureus*, які быў раней абраны як адзін з больш актыўных па ХО штаммаў [5].

Аналіз ўплыва тэмпературы на актыўнасць ХО паказаў, што ў дыяпазоне тэмператур 20–30 °С захоўваецца 100 % актыўнасці фермента (рис. 1, а). Далейшае павелічэнне тэмпературы прыводзіць да зніжэння актыўнасці ХО пры 40 °С на 14,2 %, а пры 50 °С – на 71,4 %. Поўная інактывацыя фермента адбываецца пры 60 °С і вышэй.

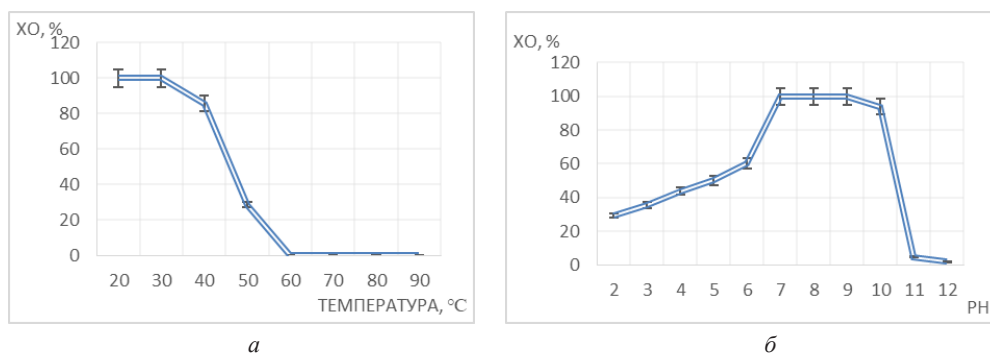


Рис. 1. Оптимальные значения температуры и рН ХО *P. aureus*

При изучении влияния кислотности среды на активность ХО установлено, что максимальная каталитическая активность фермента проявляется в интервале рН 7,0–9,0 (рис. 1, б).

Что касается термостабильности, то установлено, что 100 % активности ХО *P. aureus* сохраняется при инкубировании ферментного раствора в течение 1 ч при 20–40 °С (рис. 2, а). При 50 °С фермент инактивируется.

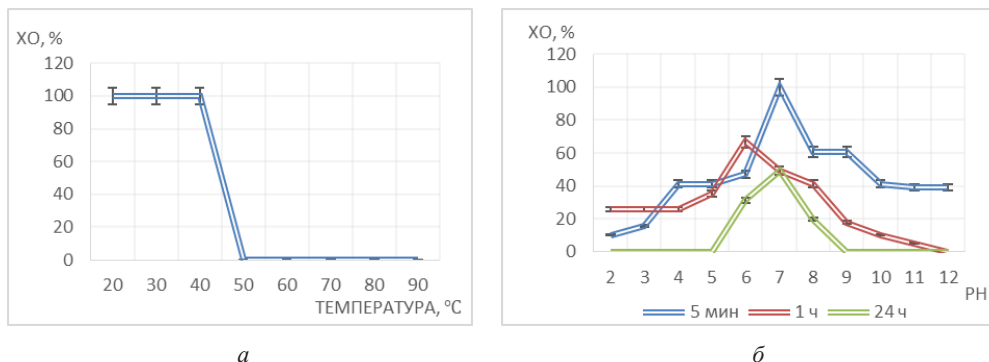


Рис. 2. Термо- и рН стабильность ХО *P. aureus*

Исследование влияния рН на стабильность ХО *P. aureus* показало, что 100 % активности фермента сохраняется при рН 7,0 в течение 5 мин (рис. 2, б). Увеличение или уменьшение концентрации водородных ионов в среде приводит к постепенной инактивации фермента. При инкубировании в течение 24 ч при рН 6,0–8,0 сохраняется 19,6–49,0 % активности ХО.

Список использованных источников

1. Noriyuki, D. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases / D. Noriyuki // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 83. – P. 825–837.
2. Kapoor, L. Cholesterol oxidase and its applications / L. Kapoor, S. Kanwar // Adv. Microbiol. – 2012. – Vol. 2. – P. 49–65.
3. Doukyu, N. Characteristics and Biotechnological Applications of Microbial Cholesterol Oxidase / N. Doukyu // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 83, № 5. – P. 825–837.
4. Doukyu, N. Cholesterol oxidase with high catalytic activity from *Pseudomonas aeruginosa*: Screening, molecular genetic analysis, expression and characterization / N. Doukyu, S. Nihei // J. of Bioscience Bioeng. – 2015. – Vol. 120. – P. 24–30.
5. Скрининг микроорганизмов – потенциальных продуцентов внеклеточных холестеролоксидаз / Л.А. Жуковская [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2022. – Т. 14. – С. 98–107.

Слизеобразующие бактерии – возможные продуценты поверхностно-активных веществ с эмульгирующими свойствами

Жунисжан А.Ж.¹, Бержанова Р.Ж.^{1,2}, Абай Г.², Кудабаев А.²,
Мукашева Т.Д.^{1,2}, Оразалы А.¹

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,
электронный адрес: aisulu_zhuniszhan@mail.ru

²ТОО «BioClean», Алматы, Казахстан

В последнее время интенсивно ведутся исследования в области изучения биоПАВ так как они находят применение в ветеринарии, пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и других областях. Микробные поверхностно-активные вещества могут широко использоваться, конкурируя с химическими поверхностно-активными веществами и остаются объектами углубленных исследований, так как они обладают следующими важными свойствами: эмульгирование, гелеобразование и выделение полисахаридной слизи, обладающих высокой гидрофобностью. Важной задачей остается поиск новых микроорганизмов-продуцентов биоПАВ, подбор условий для максимальной продукции этих веществ для дальнейшего применения их в определенной отрасли [1].

Целью данной работы явилось изолирование слизеобразующих бактерий из почв, ризосферы и тканей растений, произрастающих в предгорных и подгорных равнинах Заилийского Алатау.

Объектом для выделения микроорганизмов служили 8 видов растений из семейства *Compositae* (сложноцветные): тысячелистник мелкоцветковый (*Achillea micrantha* Willd), полынь белоземельная (*Artemisia terrae-albae* Krasch), из семейства *Lamiaceae* (яснотковые) мята перечная (*Mentha piperita*) и Melissa лекарственная (*Melissa officinalis*); из семейства *Didymochlaenaceae* (деннштедтиевые) папоротник (*Pteridium aquilinum*); из семейства *Urticacrae* (крапивные) крапива (*Urtica dioica* L); из семейства *Plantaginaceae* (подорожниковые) подорожник (*Plantago major*).

Для выделения микроорганизмов из-под растений, из ризосферы и корней растений были использованы органические среды. В ходе исследования численности микроорганизмов было выявлено, что содержание бактерий в почве из-под растений и в ризосфере была высокой, и коэффициент разведения составил 10^4 на 1 г почвы независимо от вида растений. Установлено, что численность микроорганизмов была высокой в ризосфере мяты перечной и находилась в пределах от $19,7 \pm 1,5 \cdot 10^4$ до $49,3 \pm 1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/г почвы независимо

от состава органической среды [1]. Обнаружено, что количество эндофитных микроорганизмов было меньше на два порядка и равнялось 10^2 на 1 г растительной ткани. Наибольшее количество микроорганизмов, населяющих корни растений, были изолированы из *Artemisia vulgaris*. Среди эндофитных бактерий отмечена высокая численность образующих слизь у трех растений: мята перечная, полынь белоземельная и крапива.

Распределение слизиобразующих бактерий по видам растений и источнику выделения было неравномерным. Наибольшее количество их обнаружено в ризосфере растений, наименьшее – в почве из-под растений. Показано, что высокое содержание слизиобразующих бактерий изолировано из ризосферы растений: тысячелистник мелкоцветковый, мята перечная, Melissa лекарственная, папоротник и подорожник. Среди эндофитных бактерий, высокая численность, образующих слизь отмечена у трех растений: мята перечная, полынь белоземельная и крапива [2].

Большинство слизиобразующих бактерий, 35 изолятов, на твердых средах образовывали «мукоидные» колонии, которые имели блестящий и слизистый вид на агаровых пластинках и не образовывали нити во время этого процесса. «Мукоидные» колонии обладали высокой устойчивостью к протеканию через серологические пипетки, а также характеризовались образованием вязкой пряди во время «свободного падения» с кончика пипетки. Весьма вероятно, что способность к слизиобразованию у изолятов перспективно для выявления поверхностно-активных веществ. Поэтому был определен индекс эмульгирующей активности. Индекс эмульгирующей активности используется для оценки способности слизиобразующих микроорганизмов эмульгировать две несмешивающиеся жидкости. Проанализированы 35 изолятов, выделенных из почвы, ризосферы и из корней растений и проведен их скрининг. При проведении теста на определение эмульгирующей активности все изоляты продемонстрировали образование стабильной эмульсии, индекс эмульгирования варьировал в диапазоне от 35 до 70 %. Известно, что изоляты с индексом эмульгирования более 50 % считаются перспективными продуцентами поверхностно-активных веществ. Среди слизиобразующих микроорганизмов активными продуцентами биосурфактантов являются 19 исследуемых изолятов с индексом эмульгирования, превышающим 60 %. Причем 10 изолятов являются наиболее значимыми, так как проявили высокую активность не только в отношении гексадекана, но и моторного масла. Минимальная эмульгирующая активность наблюдалась у 16 изолятов – индекс эмульгирования не превышал 21 % [1, 2].

Таким образом, установлено, что слизиобразующие бактерии проявляют высокую эмульгирующую активность в отношении гексадекана и моторного масла, что позволило выявить 19 изолятов – продуцентов эмульгирующих веществ.

Список использованных источников

1. Toledo, F.L. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture / F.L. Toledo, J. Gonzalez, C. Calvo // *Biores. Technol.* – 2008. – Vol. 99. – P. 8470–8475.
2. Iguchi, T. Emulsifying factor of hydrocarbon produced by a hydrocarbon-assimilating yeast / T. Iguchi, I. Takeda, H. Ohsawa // *Agric. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 33. – P. 1657–1658.

Изменчивость бактерий рода *Pseudomonas* при хранении различными способами

Жураева Р.Н., Зайнитдинова Л.И., Ташпулатов Ж.Ж., Лазутин Н.А.,
Косимов Д.И., Эргашев Р.Б.

Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: zajn-lyudmila@yandex.ru

В настоящее время в литературе приведено большое количество публикаций, посвященных изучению свойств микроорганизмов при хранении различными методами, а именно изменчивости, стабильности [1–3]. Жизнеспособность клеток является важным показателем, при использовании различных способов сохранения микроорганизмов [4, 5].

Известно, что при длительном хранении клетки бактерий могут утрачивать способность к дальнейшему росту, а также терять определенные свойства. В связи с этим нами изучена жизнеспособность бактерий рода *Pseudomonas* и сохранность некоторых их свойств при различных способах хранения. В коллекционном фонде Института микробиологии АН РУз неспоровые бактерии сохраняются различными методами (периодическими пересевами, под минеральным маслом, в лиофильно высушенном виде). В данной работе проанализированы штаммы *Pseudomonas stutzeri* 73, *P. stutzeri* 74, *P. stutzeri* 75, обладающие способностью синтезировать наночастицы серебра овальной и сферической формы и размером от 5 до 100 нм. После хранения в течение 10–16 лет под слоем вазелинового масла и в лиофильном виде оценивалась стабильность культурально-морфологических признаков бактерий.

В результате исследования было установлено, что штаммы *P. stutzeri* 73, *P. stutzeri* 74 и *P. stutzeri* 75 оказались наиболее чувствительными к хранению под вазелиновым маслом. При длительном пребывании клеток в этих условиях наблюдалось их отмирание, и к 10–16-му году хранения число живых клеток не превышало 10^1 – 10^3 КОЕ/мл.

Микробиологические исследования клеток, хранившихся в лиофильно высушенном состоянии показали, что они сохраняют высокую жизнеспособность. При этом лучшие показатели выживания клеток выявлены при выращивании бактерий на оптимальных питательных средах, рН, температуре и с использованием защитных сред, содержащих молоко, желатин, сахарозу. Все исследованные штаммы сохранили высокое число жизнеспособных клеток – порядка $38 \cdot 10^6$ – $53 \cdot 10^7$ клеток в ампуле (см. таблицу).

Выживаемость бактерий после длительного хранения различными способами

Промышленные бактерии	Титр клеток, КОЕ/мл		
	Хранение в агаризованной среде	Хранение под вазелиновым маслом	Хранение в лиофилизированном виде
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 73	$67 \cdot 10^7$	–	$38 \cdot 10^6$
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 74	$72 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^2$	$53 \cdot 10^7$
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 75	$69 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^1$	$47 \cdot 10^7$

Изучение физиолого-биохимических особенностей после хранения показало способность культур в качестве источника углеводов использовать арабинозу, глюкозу, сахарозу. Не усваивают лактозу и крахмал. Образуют аммиак и сероводород. Клетки растут в пределах 20–45 °С. Штамм *P. stutzeri* 75 отличается от двух других тем, что не образует ацетон; крахмал гидролизует, аммиак, индол, сероводород не образует.

Таким образом, определение выживаемости, морфологических особенностей бактерий выявило, что через 10-16 лет хранения различными методами проявляют различную сохранность жизнеспособности клеток. Установлено, что хранение неспоровых бактерий рода *Pseudomonas* для сохранения максимальной жизнеспособности лучшим методом является лиофилизация культур. При этом способе хранения не выявлено значительных изменений морфолого-физиологических признаков.

Список использованных источников

1. Куплетская, М.Б. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения / М.Б. Куплетская, А.И. Нетрусов // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 6. – С. 842.
2. Брюханов, А.Л. Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине / А.Л. Брюханов, Л.И. Нетрусов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 200–203.
3. Ravimannan, N. Investigating alternative yeast storage methods / N. Ravimannan // Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 3 (11). – P. 109–111.
4. Захаренко, М.В. Жизнеспособность бактерий рода *Bacillus* после длительного хранения в лиофилизированном состоянии / М.В. Захаренко, Е.И. Ладутько // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века : материалы 18-й Междунар. науч. конф. : в 3 ч. / под ред. С.А. Маскевича, С.С. Позняка. – Минск, 2018. – С. 138–140.
5. Ермолова, В.П. Активность энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis var. ispa-elensis* при разных методах хранения / В.П. Ермолова, С.Д. Гричишкина, А.А. Нижников // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 1. – С. 201–208.

РНК-конструкция, кодирующая иммуногенный фрагмент шиповидного белка SARS-CoV-2

Казиков Р. В., Казловский И.С., Зинченко А.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: roman.kazakov.02@bk.ru*

В связи с распространением пандемии COVID-19 задача по разработке эффективных типов вакцин остается как никогда актуальной. Наиболее перспективной является технология, основанная на использовании информационной РНК (иРНК) как носителя целевого иммуногенного антигена [1]. Среди всего спектра разрабатываемых в настоящее время вакцин технология на основе иРНК демонстрирует многообещающие результаты с доказанной высокой эффективностью против инфицирования SARS-CoV-2 и не только [2].

Целью данной работы являлось создание иРНК-конструкции путем *in vitro* транскрипции с использованием T7-РНК-полимеразы.

Для получения ДНК-прекурсора нуклеотидную последовательность, кодирующую рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2, и необходимые регуляторные элементы интегрировали в плазмиду рЕТ-42a(+) с использованием метода безлигазного клонирования. Синтез иРНК осуществляли с применением химерной SSo7d-T7-РНК-полимеразы [3].

На первом этапе работы нуклеотидные последовательности регуляторных элементов, таких как 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область, сигнальный пептид и polyA-хвост, были внедрены в вектор рЕТ-42a(+). Полученная генетическая конструкция представляет собой универсальный вектор, подходящий для последующей вставки любой необходимой нуклеотидной последовательности, кодирующей целевой антиген. Следующий этап включал клонирование участка S-гена SARS-CoV-2, кодирующий RBD, и интеграцию его в универсальную конструкцию, чтобы полипептид мог быть синтезирован в эукариотических клетках. Благодаря наличию в универсальном векторе сайтов распознавания SSo7d-T7-РНК-полимеразы была получена иРНК, содержащая все необходимые регуляторные элементы трансляции и нуклеотидную последовательность RBD. Таким образом, полученные данные могут лечь в основу создания простой, экологически чистой и относительно недорогой технологии получения иРНК-конструктов, которые в дальнейшем могут использоваться для разработки вакцин современного поколения.

Список использованных источников

1. mRNA-Based vaccines / F. Kowalzik [et al.] // Vaccines. – 2021. – Vol. 9, № 4. – Art. 390.
2. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development / E. Fang [et al.] // Sig. Transduct. Target. Ther. – 2022. – Vol. 7. – Art. 94.
3. Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases / V.V. Gurevich [et al.] // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 195, № 2. – P. 207–213.

Высокопродуктивный синтез основного капсидного белка норовирусов человека в бактериальной системе экспрессии

Казловский И.С.¹, Бельская И.В.², Казаков Р.В.¹, Юденкова Т.В.²,
Поклонская Н.В.², Зинченко А.И.¹, Амвросьева Т.В.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kazlouski.illia@gmail.com

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Норовирусы человека – доминирующие этиологические агенты острого гастроэнтерита во всем мире, вызывающие как спорадическую, так и групповую заболеваемость во всех возрастных группах. Поэтому лабораторное тестирование на наличие норовирусной инфекции в клинических образцах чрезвычайно актуально и должно быть направлено на преобладающие генотипы [1]. Для Республики Беларусь такими генотипами являются норовирусы (НоВ) GII.4, GII.17 и GI.3 [2].

В настоящее время золотым стандартом для диагностики острых гастроэнтеритов с вирусной этиологией является полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени, но этот метод требует значительных финансовых и временных затрат, а также наличие обученного высококвалифицированного персонала [1]. Как следствие, для диагностики норовирусной инфекции многие специалисты рекомендуют использовать экспресс-тесты [3]. Тем не менее, разработка таких тестов сталкивается с рядом проблем – высокая степень антигенной изменчивости, невозможность культивирования НоВ и последующее выделение целевых антигенов из вирусной биомассы, и низкая продуцирующая способность генно-инженерных штаммов-продуцентов [4–6].

Исходя из вышеизложенного целью данной работы служило получение различных вариантов капсидного белка НоВ генотипов GII.4, GII.17 и GI.3 для дальнейшего создания технологии получения экспресс-тестов.

Интеграцию генов, кодирующих полноразмерный капсид НоВ и двух доменов (N-концевой и C-концевой) в экспрессионные векторы выполняли путем метода безлигазного клонирования. Синтез целевых полипептидов осуществляли в бактериальных клетках *Escherichia coli* B121 (DE3).

Для получения полноразмерного капсида НоВ генотипов GII.4, GII.17 и GI.3 использовали коммерческий вектор pColdI, характеризующийся более мягкой индукцией экспрессии белков с помощью холодового шока. Напротив, N-концевые и C-концевые домены синтезировали с использованием классического генно-инженерного вектора pET42a(+).

Получены 6 штаммов *E. coli* – продуценты полноразмерного капсида НоВ, N-концевого и C-концевого домена генотипов GII.4 и GI.3. Синтез целевых

полипептидов генотипа НоВ GII.17 не был продемонстрирован, что требует дальнейшей оптимизации клонирования и экспрессии генов данного генотипа. Предполагается, что полученные штаммы-продуценты *E. coli* выступят как основа создания отечественной технологии получения доступных диагностических наборов для выявления генотипов НоВ эндемичных для Республики Беларусь.

Список использованных источников

1. Nordgren, J. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update / J. Nordgren, L. Svensson // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 1–19.
2. Новый генотип норовирусов GII.17 – причина роста групповой заболеваемости в Беларуси в 2015 г. / С.К. Лозюк [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А.В. Сикорского, О.К. Дорониной. – Минск : РНМБ, 2016. – Вып. 6. – С. 186–189.
3. Yoon, S.H. Diagnostic Accuracy of Immunochromatographic Tests for the Detection of Norovirus in Stool Specimens: a Systematic Review and Meta-Analysis / S.H. Yoon, H.R. Kim, J.G. Ahn // *Microbiol. Spectrum*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. e0046721.
4. Protein Expression of the Human Norovirus Capsid Gene using the Baculovirus Expression System / J.-Y. Jin [et al.] // *J. Bacteriol. Virol.* – 2011. – Vol. 41, № 3. – P. 183–187.
5. Heterologous expression of human norovirus GII.4 VP1 leads to assembly of T-4 virus-like particles / J.M. Devant [et al.] // *Antiviral Res.* – 2019. – Vol. 168. – P. 175–182.
6. Expression of Norovirus Virus-Like Particles in Different Systems / X.-J. Cheng [et al.] // *ICCSET*. – 2014. – P. 537–540.

«Омикс»-технологии в действии: поиск бактериолитических ферментов, альтернативных антибиотикам

Кудрякова И.В.¹, Афошин А.С.¹, Тарлачков С.В.¹, Леонтьевская Е.А.¹,
Галемина И.Е.^{1,2}, Руденко П.А.¹, Леонтьевская Е.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ ПНЦБ РАН, Пущино, Россия, электронный адрес: kudryakovairina@yandex.ru
²Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Проблема распространения устойчивых к антибиотикам микроорганизмов в современной биомедицине стоит остро как никогда. В связи с этим поиск альтернативных биологически активных соединений является особенно важной задачей. Среди известных литически активных соединений особый интерес представляют бактериолитические ферменты, разрушающие основной компонент клеточных стенок бактерий – пептидогликан и не вызывающие развития механизмов резистентности к ним.

В ИБФМ РАН проводится изучение бактерий рода *Lysobacter*, некоторые представители которого являются мощными продуцентами литических агентов, включая бактериолитические ферменты. Одним из таких перспективных продуцентов является штамм *L. capsici* XL1 (ранее – *Lysobacter* sp. XL1). Из культуральной жидкости бактерий получают высокоэффективный антимикробный препарат для наружного применения лизоамидазу. Антимикробная активность лизоамидазы обусловлена действием бактериолитических ферментов. На данный момент их выделено и идентифицировано пять (Л1-Л5). В настоящее время ведется разработка высокоэффективных антимикробных препаратов, в том числе для внутреннего применения, отвечающих современным запросам биомедицины и ветеринарии. Все это обуславливает поиск новых активных бактериолитических ферментов и подбор оптимальных их соотношений в качестве активной субстанции. Цель данной работы – поиск бактериолитического фермента *L. capsici* XL1 с использованием современного подхода – «омикс»-технологии.

Проведено полногеномное исследование штамма *L. capsici* XL1 с использованием платформ Illumina HiSeq 4000 и ячейки MinION R9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies) и получена полная хромосома, что позволило оценить геномную креативность штамма. Проведены полногеномные исследования малоактивного штамма *L. capsici* XL2, который образуется из штамма XL1 в определенных условиях культивирования. Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) между *L. capsici* XL1 и *L. capsici* XL2 составила 100 %. Однако были обнаружены точечные замены а. о. в нескольких генах и одном регуляторном элементе – транскрипционном факторе CRP. Обнаруженные различия

могут быть причиной перехода активного штамма в неактивный. Это требует дальнейших исследований.

Для поиска генов предполагаемых перспективных бактериолитических ферментов проведено исследование дифференциальной экспрессии генов *L. capsici* XL1 на платформе Illumina HiSeq 4000 при культивировании в оптимальных условиях продукции бактериолитических ферментов (бактериолитическая активность в отношении живых клеток *Staphylococcus aureus* 209P составила 136 ± 25 ЛЕ/мл). В качестве референсного штамма был использован штамм *L. capsici* XL2, который культивировали в идентичных условиях (бактериолитическая активность в отношении живых клеток *S. aureus* 209P составила 0 ЛЕ/мл). В ходе работы было получено количество прочтений, позволяющее провести подсчет дифференциальной экспрессии генов. В результате был обнаружен целый пул генов, увеличивших свою экспрессию, среди которых были как уже известные нам бактериолитические ферменты, так и неизученные ранее гидролитические ферменты. Также был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов *L. capsici* XL1, полученных из внеклеточных белков штамма, с последующей идентификацией белков LC-MS/MS. Полученные результаты были сопоставлены с данными транскриптомного исследования, что позволило идентифицировать истинно внеклеточные бактериолитические ферменты. Для данной работы был отобран ген сериновой протеазы *serp7* (увеличение уровня экспрессии в 7 раз), идентичный на 77 % лизинспецифической протеазе *L. enzymogenes*. Был сконструирован экспрессионный вектор pBBR1-P_{T5}-*serp7* (экспрессия гена *serp7* под регуляцией промотора T5, в качестве терминатора использован T7 терминатор). В качестве экспрессионного штамма был использован *L. capsici* XL1. Была разработана схема очистки, благодаря которой фермент Serp7 был получен в электрофоретически гомогенном виде. Проведена физико-химическая характеристика Serp7: определены оптимумы гидролиза автоклавированных клеток *S. aureus* 209P (pH, температура, молярность) и субстратная специфичность.

Дальнейшая работа будет нацелена на продолжение скрининга генов-кандидатов бактериолитических ферментов и конструирование антимикробных препаратов на их основе.

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

Поиск и исследование генов, участвующих в метаболизме D-2-гидроксиглутарата в *Pantoea ananatis*

Кузнецова А.А., Самсонов В.В., Ростова Ю.Г., Самсонова С.А.,
Зиятдинов М.Х., Кирюхин М.Ю.

АО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»,
Москва, Россия, электронный адрес: Anna_Kuznetsova@agri.ru

Escherichia coli и *Pantoea ananatis* широко используются в биотехнологии для метаболической инженерии. Синтез L-серина в данных микроорганизмах начинается с превращения D-3-фосфоглицерата в 3-фосфогидроксипируват. Эта реакция катализируется D-3-фосфоглицератдегидрогеназой (SerA). Существует три типа D-3-фосфоглицератдегидрогеназ с различными свойствами и структурой [1]. *E. coli* и *P. ananatis* содержат SerA второго типа. Для эффективной работы этого фермента необходимо сопряжение реакций превращения D-3-фосфоглицерата в 3-фосфогидроксипируват и образования D-2-гидроксиглутарата (D-2-HGA) из 2-кетоглутарата (2-KG) [1]. Сведения о ферментах, которые участвуют в метаболизме D-2-HGA, в семействе *Enterobacteriaceae* к которому принадлежат *E. coli* и *P. ananatis* отсутствуют.

При поиске генов, продукты которых, ускоряют рост *P. ananatis* на среде с D-2-HGA в качестве источника углерода, нами были выявлены гены, кодирующие белки внутренней мембраны *kgtP*, *yjhB* и *ybhI*, а так же цитоплазматический белок *ydiJ*.

Показано, что *ydiJ* кодирует ранее не описанную D-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (D2HGDH) *P. ananatis* и *E. coli* (D2HGDH*Pa* и D2HGDH*Ec*). Фермент содержит FAD и 4Fe-4S кластеры в отличие от ранее описанного D2HGDH из *P. stutzeri* [2], который содержит только FAD кластер.

Инактивация *ydiJ* *P. ananatis* и *E. coli* приводила к накоплению D-2-HGA до 2,7 и 4,2 г/л⁻¹ соответственно. Рекомбинантные D2HGDH*Ec* и D2HGDH*Pa* были очищены до гомогенности и охарактеризованы [3]. Филогенетический анализ подтвердил, что белки, близкородственные YdiJ, встречаются у большой группы *Proteobacteria Phylum* и преобладают у γ -*Proteobacteria*. Открытие нового семейства D-2-гидроксиглутаратдегидрогеназ, кодируемых геном *ydiJ*, может иметь фундаментальное значение для метаболической инженерии.

Для изучения активности промотора гена *ydiJ* была разработана репортерная система на основе β -галактозидазы *E. coli*. В нее входили штаммы:

- 1) с высокой внутриклеточной концентрацией D-2-гидроксиглутарата, содержащий *lacZ* под контролем промотора гена *ydiJ*;
- 2) с отсутствием внутриклеточного D-2-гидроксиглутарата, содержащий *lacZ* под контролем промотора гена *ydiJ*.

Выявлено наличие достоверно измеряемого, хотя и низкого по сравнению с положительным контролем, повышения уровня сигнала в штамме с высокой концентрацией внутриклеточного D-2-HGA в сравнении со штаммом, в котором данное вещество отсутствовало. Таким образом, экспрессия гена *ydiJ* повышается в присутствии D-2-гидроксиглутарата.

Идентифицирована дополнительная функция белка, кодируемого геном *kgtP*. Показано, что он транспортирует не только 2-KG, но и D-2-HGA.

Показано, что, продукты генов *yjhB* и *ybhI* так же являются импортерами D-2-HGA. Это первое сообщение о транспортерах D-2-HGA, которое убедительно подтверждает гипотезу о том, что D-2-HGA является не только промежуточным продуктом метаболизма, но и физиологически значимым веществом у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Grant, G.A. Contrasting catalytic and allosteric mechanisms for phosphoglycerate dehydrogenases / G.A. Grant // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 519, № 2. – P. 175–185.
2. Coupling between D-3-phosphoglycerate dehydrogenase and D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase drives bacterial L-serine synthesis / W. Zhang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – Vol. 114, № 36. – P. E7574–E7582.
3. Revealing a New Family of D-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenases in *Escherichia coli* and *Pantoea ananatis* Encoded by *ydiJ* / V.V. Samsonov [et al.] // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, № 9. – P. 1–17.

Получение продуцентов интерферона- $\lambda 3$ свиньи на основе бактерий *Escherichia coli*

Кулешова Ю.М., Потапович М.И., Титова А.Д., Острикова К.В.,
Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: Yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Интерфероны (ИФНы) представляют собой гетерогенную группу белков, разделяющихся по строению и особенностям связывания с клеточными рецепторами на три типа. В последнее время активно изучают III тип интерферонов, куда входят ИФНы-лямбда (λ), особенностью которых является выраженная тканеспецифичность, позволяющая избежать нежелательных побочных эффектов при их введении в организм для борьбы с инфекциями. Установлено, что ИФНы- λ подавляют репликацию вирусов и ослабляют их цитопатическое воздействие, способствуют ликвидации зараженных вирусом клеток с помощью Т-киллеров, могут проявлять проапоптотическую и антипролиферативную активность *in vitro*, способны участвовать в снижении аллергической реакции и повышении реактивности дыхательных путей [1]. Это указывает на значительный терапевтический потенциал ИФН- λ .

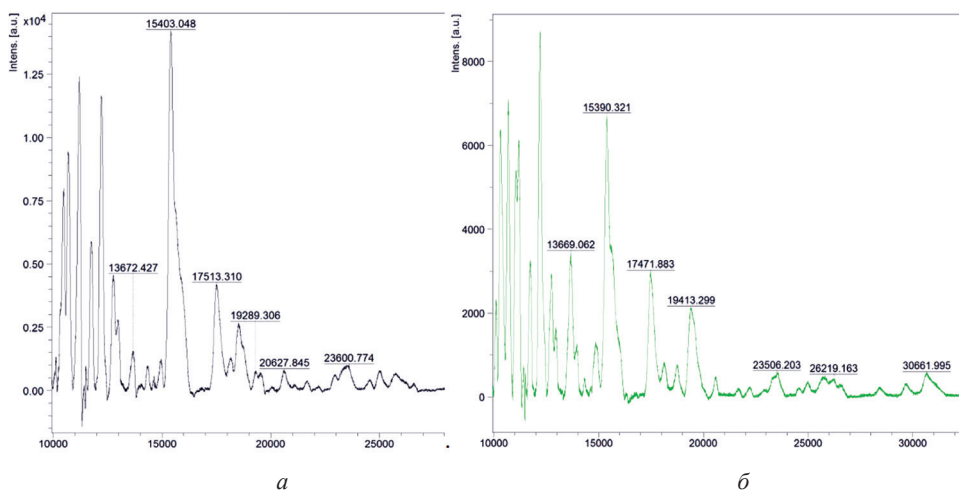
Целью настоящей работы являлось получение бактерий *Escherichia coli*, способных к синтезу рекомбинантного свиного ИФН- $\lambda 3$.

Зрелый свиной ИФН- $\lambda 3$ является белком, состоящим из 199 аминокислотных остатков, первые 27 из которых составляют лидерную последовательность, участвующую в транспорте белка в эндоплазматическом ретикулуме эукариотической клетки. Ген ИФН- $\lambda 3$ свиньи находится на 6-й хромосоме и содержит интроны, удаляющиеся в процессе созревания мРНК в клетках эукариот. Учитывая перечисленное, был осуществлен дизайн синтетического гена свиного ИФН- $\lambda 3$, пригодного для экспрессии в клетках бактерий *E. coli* на основе нуклеотидной последовательности зрелой мРНК ИФН- $\lambda 3$, депонированной в базе данных GenBank (GeneID:100310828), из которой удалили последовательность лидерного пептида и заменили редко встречающиеся у *E. coli* кодоны на синонимичные. Также в ген включили фланкирующие сайты для распознавания рестриктазой SapI. Оптимизированная нуклеотидная последовательность была синтезирована фирмой Integrated DNA technologies (США). В результате встраивания синтетической последовательности в вектор pD861 по сайтам рестрикции SapI нами была сконструирована плаزمид, обозначенная как pD λ , пригодная для экспрессии свиного ИФН- $\lambda 3$ клетками *E. coli* под контролем промотора рамнозного оперона.

Для создания бактерий, способных к синтезу рекомбинантного свиного-ИФН- $\lambda 3$, конструкцией pD λ трансформировали штаммы *E. coli* BL21-Codon

Plus(DE3)-RIPL, адаптированные для экспрессии эукариотических генов. В результате была получена серия штаммов *E. coli* CP/pDλ, стабильно наследующих конструкцию pDλ и накапливающих белок массой около 19 кДа в ответ на индукцию моногидратом L-рамнозы. В неиндуцированных клетках указанный белок синтезируется в следовых количествах.

Для идентификации синтезируемого бактериями штамма CP/pDλ3 рекомбинантного белка использовали спектрометрический анализ на времяпролетном масс-спектрометре с источником ионизации МАЛДИ (см. рисунок).



Масс-спектрометрический анализ МАЛДИ белков полных лизатов клеток *E. coli* CP/pDλ. Отношение молекулярной массы к заряду иона (m/z): *a* – образец без индукции моногидратом L-рамнозы; *б* – образец спустя 18 ч после индукции моногидратом L-рамнозы. Значение m/z , равное 19 413,299, для однозарядного иона соответствует молекулярной массе 19 413,299 Да

Приведенные данные анализа демонстрируют накопление индуцированными бактериями белка с молекулярной массой 19 413 Да. Учитывая то, что расчетная масса рекомбинантного интерферона λ3 составляет 19 237 Да, можно заключить, что белок, синтезируемый клетками *E. coli* CP/pDλ3 в ответ на индукцию L-рамнозой, является рекомбинантным свиным ИФН-λ3.

Таким образом, нами сконструирован вектор pDλ, содержащий синтетический ген свиного интерферона λ3 и получен штамм *E. coli* CP/pDλ3, синтезирующий рекомбинантный свиной интерферон λ3.

Список использованных источников

1. Интерфероны лямбда – возможности терапевтического применения / Н.А. Кихтенко [и др.] // Сибир. науч. мед. журн. – 2020. – Т. 40, № 2. – С. 15–23.

Исследование влияния состава питательной среды на продукцию пиридоксина штаммом *Lactobacillus salivarius* В-2214

Манухина О.А., Епишкина Ю.М., Хромова Н.Ю., Шакир И.В., Панфилов В.И.

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

электронный адрес: khromova.n.i@muctr.ru

Желудочно-кишечный тракт является естественной средой обитания огромного числа микроорганизмов, максимальное количество которых приходится на толстый кишечник и составляет примерно от 10^{10} до 10^{11} клеток на грамм содержимого [1]. Совокупность всех микроорганизмов кишечника называют кишечной микробиотой. Она играет существенную роль в переваривании пищи и оказывает влияние на многие другие функции организма-хозяина [2].

Среди кишечной микробиоты можно выделить полезные, условно-патогенные и патогенные бактерии. Полезные бактерии, называемые также пробиотиками, не только безопасны для хозяина, но и ограничивают рост патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также оказывают множество полезных физиологических эффектов. Большинство используемых сегодня пробиотиков относятся к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [3]. Данные микроорганизмы дополнительно могут являться важными поставщиками водорастворимых витаминов группы В, выполняющих роль кофакторов и участвующих во многих биохимических реакциях в организме. Они продуцируют такие витамины как биотин, тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, фолиевая кислота и кобаламин [4, 5]. Целью настоящей работы являлось исследование влияния начальной концентрации казаминовых кислот и глюкозы в питательной среде на внеклеточное накопление пиридоксина штаммом *L. salivarius* В-2214 и определение оптимальных концентраций компонентов для его максимальной продукции методом математического планирования эксперимента – ротатабельного композиционного плана второго порядка (РЦКП).

Штамм *L. salivarius* В-2214 был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ, Россия). Для получения инокулята лактобациллы культивировали в среде MRS при 37 °С в течение 24 ч. Для определения влияния концентраций компонентов на внеклеточное накопление пиридоксина использовали среду для анализа фолиевой кислоты по формуле Difco™. Определение содержания пиридоксина в образцах проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 105М» «Люмэкс» (Санкт-Петер-

бург, Россия). При проведении РЦКП варьировали концентрацию казаминовых кислот (от 0,5 до 11,5 г/л) – X_1 и глюкозы (от 0,5 до 39,5 г/л) – X_2 . Оптимизацию проводили по содержанию пиридоксина (мг/л) – Y . Уровни варьирования факторов и матрица планирования эксперимента с результатами РЦКП представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Уровни варьирования факторов РЦКП

Фактор		Значение				
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
X_1	Концентрация казаминовых кислот, г/л	0,5	2,1	6	9,9	11,5
X_2	Концентрация глюкозы, г/л	0,5	6,2	20	33,8	39,5

Таблица 2. Матрица планирования РЦКП

Показатель	Номер опыта	Фактор						Результат	
		Z_0	Z_1	Z_2	Z_1^2	Z_2^2	Z_1Z_2	Концентрация, мг/л	
								Эксп.	Расч.
Ядро плана	1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	2,29	2,63
	2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1,98	1,67
	3	+1	+1	-1	+1	+1	-1	0,95	1,26
	4	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2,06	1,72
Звездные точки	5	+1	+1,414	0	+2	0	0	1,62	1,64
	6	+1	-1,414	0	+2	0	0	2,59	2,57
	7	+1	0	+1,414	0	+2	0	0,89	1,36
	8	+1	0	-1,414	0	+2	0	2,18	1,71
Центр плана	9	+1	0	0	0	0	0	2,31	2,66
	10	+1	0	0	0	0	0	2,86	2,66
	11	+1	0	0	0	0	0	2,82	2,66
	12	+1	0	0	0	0	0	2,53	2,66
	13	+1	0	0	0	0	0	2,78	2,66
b_j		2,66	-0,33	-0,13	-0,28	-0,56	0,36	Оценка значимости коэффициентов	
t_j		0,29	0,23	0,23	0,25	0,25	0,33		

Было получено уравнение регрессии, описывающее содержание пиридоксина в ферментационном бульоне *L. salivarius* В-2214 в зависимости от начальных концентраций казаминовых кислот и глюкозы в питательной среде (1):

$$Y = 2,66 - 0,33Z_1 - 0,28Z_1^2 - 0,56Z_2^2 + 0,36Z_1Z_2. \quad (1)$$

Установлено, что на продукцию пиридоксина оказывали влияние как концентрации рассмотренных компонентов, так и эффект их парного взаимодействия. Оптимальные концентрации казаминовых кислот и глюкозы соответствовали центру плана – 6 и 20 г/л.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-1171.2021.5).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ishibashi, N. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health / N. Ishibashi, T. Yaeshima, H. Hayasawa // *Malaysian J. of Nutrition*. – 1997. – Vol. 3, № 2. – P. 149–159.
2. Microbiota medicine: towards clinical revolution / P. Gebreyel [et al.] // *J. of Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 1–20.
3. Pineiro, M. Probiotic bacteria: legislative framework-requirements to evidence basis / M. Pineiro, C. Stanton // *The Journal of nutrition*. – 2007. – Vol. 137, № 3. – P. 850S–853S.
4. Tang, H. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota / H. Tang, W. Huang, Y.F. Yao // *Liver*. – 2023. – Vol. 134. – P. 135.
5. Rossi, M. Folate production by probiotic bacteria / M. Rossi, A. Amaretti, S. Raimondi // *Nutrients*. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 118–134.

Влияние γ -облучения на активность биосурфактантов бактерий рода *Rhodococcus*

Махсумханов А.А.¹, Алимова Б.Х.¹, Шарифов М.Р.¹,
Пулатова О.М.¹, Исматов Н.Б.²

¹Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Ташкент, Узбекистан, электронный адрес: amakhsun@mail.ru

²Институт ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан,
Улугбек, Узбекистан

Биосурфактанты – это вторичные метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности. Являясь по своей природе амфифильными молекулами, они выступают альтернативой синтетическим поверхностно-активным веществам (ПАВ) [1, 2]. Одним из механизмов повышения выхода биосурфактантов микроорганизмами является повышение продуктивности штаммов [3, 4]. Одним из физических методов мутагенеза является γ -облучение, которое на более высоких частотах имеет гораздо большую проникающую способность и несет большее изменение в клетке.

Целью исследования является изучение влияния различных доз γ -облучения на выживаемость и биосурфактантную активность представителей разных видов бактерий рода *Rhodococcus*. Облучение проводили на установке с возрастающими дозами γ -облучения мощностью экспозиционной дозы 0,05 Гр/сек, оснащенной источником излучения ⁶⁰Со, а междозовые интервалы составляли 20, 15, 10, 5, 4, 3 и 2 кГр.

При определении индекса эмульгирования выделенных мутантных штаммов показано, что при воздействии γ -излучением в дозе 2–4 кГр, для штаммов (M1 RE07-2/2), (M1 RE07-2/3), (M2 RE09-3/5) и (M2 343-2/2) ИЭ составил 80, 87, 78 и 76 % соответственно, что в 1,2–1,3 раза выше по сравнению с исходным штаммом. Для мутантного штамма M1 2/5-5/2 ИЭ составил 57 %, что в 2,5 раза выше по отношению к природному штамму, тогда как для мутантного штамма M1 RHA-5/3 ИЭ составил 75 %, что в 1,66 раза выше по сравнению с природным вариантом. Повышенный ИЭ к дозе облучения 5 кГр также наблюдался для штаммов M1 2/5-5/2, M1 HN4-5/10, M1 R.PHN5-3/4 и M3 RPHN5-5/2 (см. таблицу).

Следует отметить, что повышение биосурфактантной активности наблюдалось в дозах облучения от 2 до 5 кГр, так для штамма M3 RHA-3/1 он составил 64,28 % при дозе облучения 3 кГр, тогда как для штамма M1 2/5-5/2 – 57,14 % при дозе облучения 5 кГр. Однако максимальный ИЭ для бактерий рода *Rhodococcus* наблюдался в дозах облучения от 2 до 3 кГр.

Активные мутантные штаммы бактерий рода *Rhodococcus*

№	Штамм	ИЭ на среде RS, %	Степень увеличения ИЭ
1	M1 2/5-5/2	57,14	1,3
2	M2 2/5-4/5	61,36	1,4
3	M2 2/5-2/3	53,48	1,2
4	M3 RHA-3/1	64,28	1,9
5	M1 RHA-4/1	60	1,8
6	M1 RHA-3/3	75	2,2
7	M2 343-2/2	76	1,9
8	M2 343-3/1	86,46	2,2
9	M2 HN4-2/1	52,5	1,6
10	M2 HN4-3/1	67,44	2,1
11	M1RE 07-2/2	80	1,7
12	M1 RE 07-2/3	87	1,8
13	M3 MRE 07-4/5	74	1,6
14	M1 HN4-5/10	45,45	1,1
15	M1 R.PHN5-3/4	76	1,9
16	M3 RPHN5-5/2	45	1,4

Список использованных источников

1. Jimoh, A.A. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability / A.A. Jimoh, J. Lin // *Ecotoxicol Environ.* – 2019. – Vol. 30. – P. 109607. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109607
2. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery / R.B. Thiago [et al.] // *Biotechnology & Ecotoxicology Bioengineering.* – 2021. – Vol. 8. – P. 115. doi: org/10.3390/bioengineering8080115
3. *Rhodococcus* for the production of valuable compounds / M. Cappelletti [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2020. – Vol. 104. – P. 8567–8594. doi: org/10.1007/s00253-020-10861-z
4. Механизмы иммуномодулирующей и мембранотропной активности трегалолипидных биосурфактантов / М.С. Куюкина [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 211–222. doi: 10.31857/S0555109920030071

Определение протеолитической активности дрожжей родов *Kluveromyces* и *Debaromyces* для получения биологически активных пептидов в молочной сыворотке

Мижева А.А., Фоменко И.А., Машенцева Н.Г.

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,
Москва, Россия,

электронный адрес: mizhevaaa@mgupp.ru

Молочная сыворотка – жидкий вторичный отход переработки молока. Ежегодно количество образующейся молочной сыворотки возрастает, а следовательно, появляется необходимость в разработке новых способов переработки.

Молочная сыворотка в своем составе содержит витамины, органические кислоты, лактозу, сывороточные белки, минеральные вещества. Благодаря наличию в ней вышеперечисленных компонентов она является отличным субстратом для ферментации микроорганизмами и получения биологически активных веществ.

В настоящее время большое внимание уделено биологически активным пептидам (БАП), получаемых путем гидролиза белков молочной сыворотки, а многочисленные исследования доказывают наличие в них антимикробных, иммуномодулирующих и ряда других, ценных для человека свойств. Пептиды представляют собой короткие цепочки, обычно состоящие из 2–20 аминокислотных остатков, записанных в первичной структуре молочных белков, которые высвобождаются в процессе гидролиза ферментными препаратами протеолитического действия или путем микробной ферментации [1].

Проведенные ранее исследования доказывают способность дрожжей образовывать биологически активные пептиды [2]. Для изучения микробного гидролиза сывороточных белков с образованием БАП были отобраны 4 штамма дрожжей родов *Kluveromyces* и *Debaromyces* из БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. Определение протеолитической активности культур осуществляли на субстрате, состоящем из стерильного обезжиренного молока и микробиологического агара, смешанных в равных пропорциях. Инкубирование засеянных чашек Петри вели в течение 48 ч при температурах 25 и 37 °С. По истечении данного времени на плотных питательных средах должны образоваться зоны просветления, что свидетельствует о синтезе микроорганизмом протеолитических ферментов [3].

На рис. 1–4 представлены результаты проведенного исследования.

При выращивании на молочном агаре гидролиз белков обнаруживается по наличию зон просветления вокруг колоний за счет разрушения преципитата: чем больше диаметр зоны просветления, тем выше протеолитическая актив-

ность микроорганизмов. Четкие ореолы вокруг колоний штаммов *K. marxianus* Y-1205 и *K. marxianus* Y-4570 составили 7 и 18 мм соответственно, что свидетельствует о хорошей протеолитической активности дрожжей в сравнении с результатами, полученными *D. hansenii* Y-2619 и *D. hansenii* Y-3863, – 2 и 1 мм.



Рис. 1. Штамм *K. marxianus* Y-1205



Рис. 2. Штамм *K. marxianus* Y-4570



Рис. 3. Штамм *D. hansenii* Y-2619

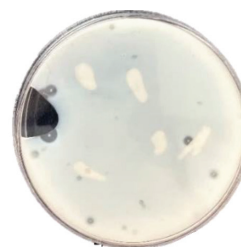


Рис. 4. Штамм *D. hansenii* Y-3863

Согласно полученным данным, наибольшая протеолитическая активность на агаровой среде с обезжиренным молоком наблюдалась у дрожжей *K. marxianus* Y-4570, а наименьшая – у *D. hansenii* Y-2619 и *D. hansenii* Y-3863, что является основным этапом скрининга штаммов, потенциально способных образовывать БАП на таком субстрате как молочная сыворотка.

Список использованных источников

1. Рязанцева, К.А. Гидролизаты сывороточного белка как источник биологически активных пептидов для включения в функциональные продукты питания / К.А. Рязанцева // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1, № 1. – С. 475–480.
2. Rai, A.K. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry / A.K. Rai, A. Pandey, D. Sahu // Trends in Food Science & Technology. – 2019. – Vol. 83. – P. 129–137.
3. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar / T. Pailin [et al.] // Letters in applied microbiology. – 2001. – Vol. 33, № 1. – P. 45–49.

Влияние источников углерода и азота на протеолитическую активность термофильных бактерий

Мирзалиева Н.А., Романова М.В., Белодед А.В.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, Россия,
электронный адрес: romanovamariav@gmail.com*

Протеазы – группа ферментов, осуществляющих реакции гидролиза белков и пептидов. Микробные ферменты, в частности термофильных бактерий, характеризуются специфичностью, стабильностью и активностью в широком диапазоне физических условий [1, 2]. Термофильные протеазы имеют большой потенциал применения в биотехнологии, сельском хозяйстве, химической технологии и биомедицине [3]. Поскольку синтез ферментов зависит от физико-химических условий культивирования, актуальным является подбор состава питательной среды для получения протеаз. Целью данной работы являлось изучение влияния источника углерода и азота в составе питательной среды на протеолитическую активность термофильных бактерий.

В качестве продуцента секретируемых протеаз использовали термофильный штамм Кб.1.Гл.8, который по совокупности физиолого-биохимических признаков и на основе анализа гена 16S рРНК был отнесен к роду *Bacillus*. Культивирование проводили при 50°C в аэробных условиях с варьированием источников углерода (глюкоза, ксилоза, фруктоза, маннит, мальтоза, сахароза, крахмал, карбоксиметилцеллюлоза) и азота (NH_4Cl , NH_4NO_3 , NaNO_3 , триптон, дрожжевой экстракт, сухое молоко, соевая мука, казеин, желатин) в количестве 10 г/л. Протеолитическую активность культуральной жидкости определяли спектрофотометрически (280 нм) по продуктам гидролиза казеина. Результаты измерения протеолитической активности на 24-й и 48-й часы культивирования представлены на рис. 1 и 2.

Результаты определения протеолитической активности были подтверждены зимографическими анализом протеаз культуральной жидкости с включенным в матрицу геля казеином. Электрофоретическими методами в культуральной жидкости были выявлены протеазы различной молекулярной массы: от 20 до 75 кДа. Активность некоторых ферментов в геле варьировалась в зависимости от использованных источников углерода и азота в ходе культивирования штамма.

На основании полученных результатов было установлено, что высокая протеолитическая активность у термофильного штамма Кб.1.Гл.8 наблюдается при использовании в качестве источника углерода ксилозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, а в качестве источников азота – дрожжевого экстракта,

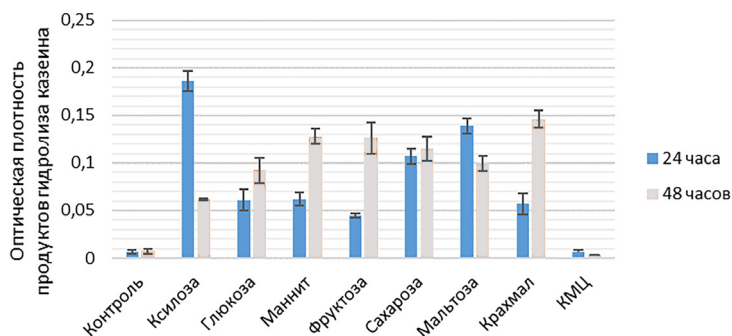


Рис. 1. Протеолитическая активность термофильного штамма Кб.1.Гл.8 при культивировании с разными источниками углерода

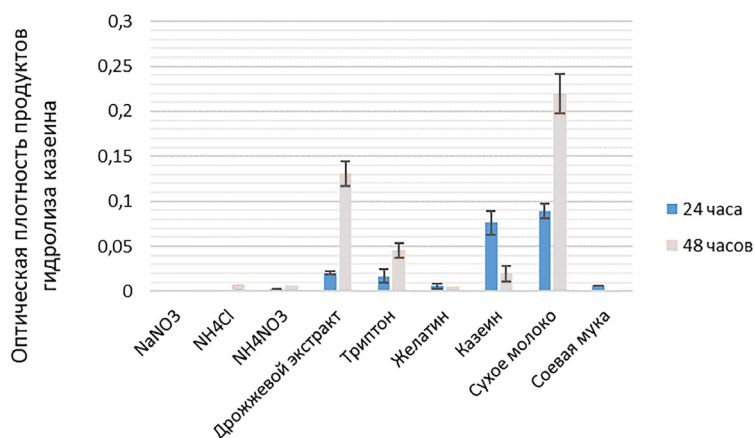


Рис. 2. Протеолитическая активность термофильного штамма Кб.1.Гл.8 при культивировании с разными источниками азота

казеина и сухого молока. Полученные данные можно использовать для разработки питательных сред с целью увеличения выхода секретируемых бактериальных протеаз.

Список использованных источников

1. Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization / A. Ramkumar [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, № 12442. – P. 1–15.
2. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts / J. Atalah [et al.] // Bioresource technology. – 2019. – № 280. – P. 478–488.
3. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications / K. Dmorné [et al.] // Journal of microbiology and biotechnology. – 2017. – Vol. 27, № 4. – P. 649–659.

Модификация метаболизма *Corynebacterium glutamicum* для анаэробной конверсии лактата в пропионат

Мустахимов И.И., Решетников А.С.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия,
электронный адрес: mii80@rambler.ru

Лактатный ацидоз сельскохозяйственных животных – проблема, обусловленная несбалансированностью кормов вследствие широкого использования концентратов, вырабатываемых из высококрахмалистых культур. Для профилактики и лечения ацидоза необходимо разрабатывать способы удаления лактата, образующегося в рубце крупного рогатого скота или поступающего в организм животного с силосом. Один из методов лечения и профилактики ацидозов – введение в кормовые смеси в качестве пробиотиков микроорганизмов, утилизирующих изоформы лактата. Хотя в составе естественной микробиоты рубца присутствуют облигатно анаэробные бактерии, способные потреблять лактат (в частности, бактерии рода *Propionibacterium*), однако их применение затруднено ввиду низкой скорости роста анаэробов, кроме того, их активность угнетается при пониженных значениях pH. В качестве пробиотиков целесообразно применять факультативно анаэробные бактерии, для которых характерны более высокие скорости роста, относительно высокая плотность биомассы и способность использовать изоформы молочной кислоты. В связи с этим целью работы являлось создание модифицированных штаммов факультативно анаэробной бактерии *Corynebacterium glutamicum*, эффективно использующих лактат в анаэробных условиях, как альтернативы строго анаэробным микробным симбионтам рубца.

Анаэробные бактерии рубца восстанавливают D-лактат в пропионат за счет акрилатного метаболического пути, состоящего из пропионил-КоА трансферазы (взаимопревращение пропионил-КоА и D-лактата с образованием пропионата и D-лактил-КоА), лактоил-КоА дегидратазы (образование акрилоил-КоА из лактил-КоА) и акрилоил-КоА редуктазы, катализирует НАДФН-зависимое восстановление акрилоил-КоА до пропионил-КоА).

Поскольку рост *C. glutamicum* в анаэробных условиях тесно связан с регенерацией окисленной формы НАД⁺, серией аминокислотных замен нами была получена мутантная форма фермента AcsI, не проявляющая активности с НАДФН как кофактором, при этом удельная активность фермента с НАДН составила $V_{\max(\text{НАДН})} = 1,1 \text{ Е/мг}$; $K_m(\text{НАДН}) = 0,13 \text{ мМ}$. Ген, кодирующий полученную мутантную форму AcsI-Mut5, был слит с P_{eftu} промотором *C. glutamicum* и интегрирован в CGP3 профаг, содержащийся в геноме данной бактерии.

В клетках полученного мутантного штамма НАДН-зависимая активность акрилил-КоА редуктазы составила 100 нмоль/мин/мг белка.

Гены, кодирующие D-лактатдегидрогеназу (ldhD) из *Lactobacillus delbrueckii* и пропионил-КоА-редуктазу (Pct) из *Clostridium propionicum*, клонировали под промотор SP6 в плазмиду pJYS3 с образованием вектора pJYS-pst-ldhD. Оперон, кодирующий три гена D-лактоил-КоА-дегидратазы (Lsd) из *Clostridium propionicum*, клонировали в pJYS2 под промотор SP6 с получением вектора pJYS-Lsd. Полученными плазмидами pJYS-pst-ldhD и pJYS-Lsd трансформировали клетки штамма *C. glutamicum* (insert-Acu; insert-SP6).

Полученный штамм *C. glutamicum* (insert-Acu; insert-SP6; pJYS-pst-ldhD; pJYS-Lsd) выращивали аэробно до 1 ед. оптической плотности (ОП). Затем в среду добавляли 100 мМ ИПТГ и рост штамма продолжали в анаэробных условиях до 3 ед ОП. ВЭЖХ анализ культуральной среды выявил накопление до 150 мМ (11 г/л) пропионата, что указывает на функционирование сконструированного акрилатного цикла в клетках *C. glutamicum*.

Дополнительно проведена работа по оценке способности *C. glutamicum* (insert-Acu; insert-SP6) утилизировать D-лактат из среды культивирования. Для этого клетки трансформировали плазмидами pJYS-Lsd и pJYS-pst (аналог pJYS-pst-ldhD, несущий только пропионил-КоА-редуктазу) и выращивали анаэробно в среде с 50 мМ D-лактата и 50 мМ ИПТГ. Убыль лактата после 24 ч роста составила 10 мМ, что указывает на его поглощение и включение его в акрилатный цикл. В аналогичных условиях клетки *Propionibacterium ferudenreichii* ssp *shermanii* потребляли 20 мМ лактата.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность функционирования акрилатного метаболического пути синтеза пропионата в клетках *C. glutamicum*, а также получен генетически-модифицированный штамм, накапливающий пропионат в среде роста. Полученный штамм в дальнейшем может быть применен в биотехнологии для получения пропионата и для возможной профилактики лактатного ацидоза крупного рогатого скота. Однако рекомбинантный штамм *C. glutamicum* требует дальнейших модификаций, направленных на увеличение выхода целевого продукта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07044 мк.

Изменение условий культивирования морских грибов как способ влияния на продукцию вторичных метаболитов

Нестеренко Л.Е.^{1,2}, Попов Р.С.¹, Юрченко Е.А.¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, Россия,
электронный адрес: nesterenko.le@students.dvfu.ru

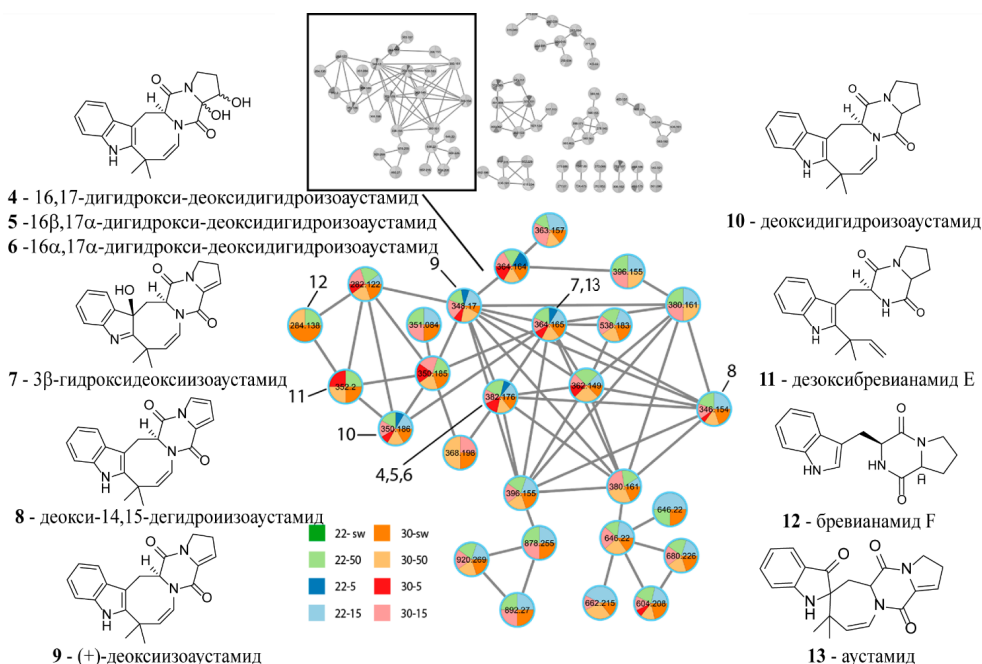
²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку новых стратегий и подходов с целью увеличения химического разнообразия биологически активных вторичных метаболитов, выделяемых из морских грибов. Изменение условий культивирования морских грибов способно привести к изменению метаболитного профиля или увеличению выхода целевых биологически активных метаболитов [1].

Ранее в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН) из культуры морского гриба *Penicillium hispanicum* КММ 4689 была выделена серия индольных алкалоидов [2]. В продолжение этих исследований было изучено влияние условий культивирования этого продуцента на выход биологически активных соединений. Гриб культивировали при температуре 22 и 30 °С и при содержании морской соли от 5 до 50 г/л культуральной среды. Полученные экстракты исследованы методами ТСХ, ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС.

При помощи базы данных лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН и базы данных GNPS [3] в ВЭЖХ-МС хроматограммах экстрактов были обнаружены пики, идентифицированные с 25 известными соединениями, но только 14 из них обнаружены во всех экстрактах. Также с помощью биоинформационного анализа данных Molecular Networking [3] была проведена визуализация данных и упорядочивание спектров по кластерам. Самый крупный кластер был отнесен к бревинанамидным алкалоидам и содержал не только идентифицированные соединения, но и несколько неидентифицированных (см. рисунок).

Гипосолевые условия (особенно при более низкой температуре) культивирования значительно снижали содержание практически всех обнаруженных соединений. Гиперсоленость вызывала изменение метаболизма, выражающееся в увеличении или уменьшении содержания отдельных обнаруженных метаболитов. Кроме того, около 20 видимых пиков в ВЭЖХ-МС хроматограммах не были идентифицированы.



Молекулярная сеть на основе признаков экстрактов штамма гриба *Penicillium hispanicum* КММ 4689. На круговой диаграмме показано распределение метаболитов экстракта согласно легенде. Масса на круговой диаграмме соответствует аддукту $[M+H]^+$

Полученные данные позволяют сделать вывод, что понижение температуры культивирования и снижение содержания морской соли при культивировании данного штамма морского гриба может быть эффективным способом получения новых биологически активных соединений.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

Список использованных источников

1. Discovery of Primarolides A and B from Marine Fungus *Asteromyces cruciatus* Using Osmotic Stress and Treatment with Suberoylanilide Hydroxamic Acid / H.A. Igboeli [et al.] // Mar. Drugs. – 2019. – Vol. 17, № 8. – Art. 435.
2. New Deoxyisoaustamide Derivatives from the Coral-Derived Fungus *Penicillium dimorphosporum* KMM 4689 / O.I. Zhuravleva [et al.] // Mar. Drugs. – 2021. – Vol. 19, № 1. – Art. 32.
3. Global Natural Products Social Molecular Networking [Electronic resource]. – Mode of access: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp?redirect=auth>. – Date of access: 22.03.2023.

Комплексы на основе нанокompозита альгинат-серебро и энрофлоксацина: получение и свойства

Николайчук В.В.¹, Гецевич Е.О.¹, Куликовская В.И.¹, Ладутько Е.И.², Сидоренко А.В.²

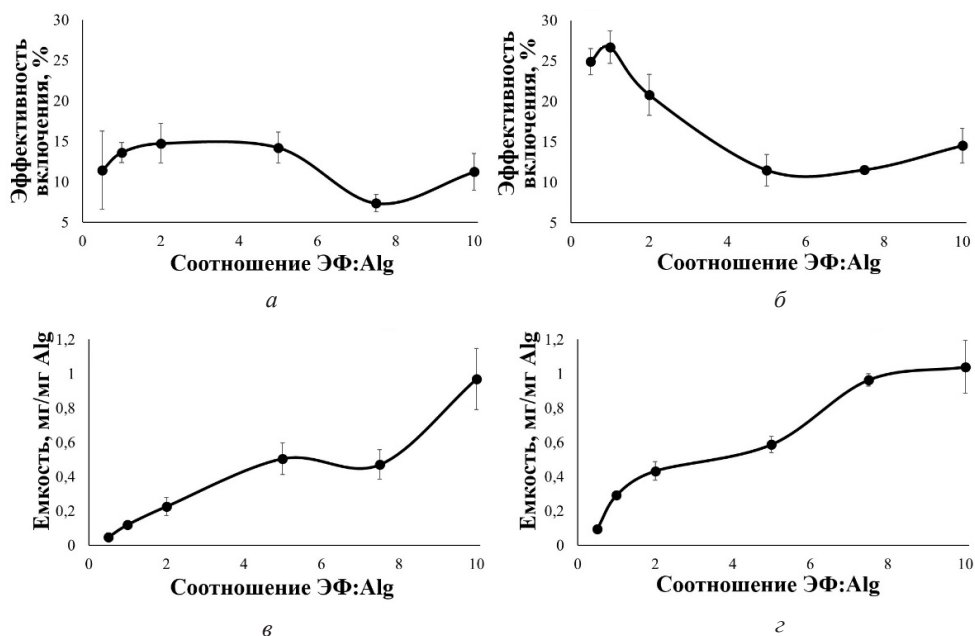
¹Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: vica10bcn@gmail.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Неконтролируемое и нерациональное применение антибактериальных препаратов стало причиной распространения антибиотикоустойчивости среди патогенных бактерий и, как следствие, снижения эффективности терапии многих инфекционных заболеваний [1]. Одним из перспективных подходов для борьбы с антибиотикорезистентными патогенами является разработка новых лекарственных форм для веществ с доказанной антимикробной активностью, например, путем создания полимер-неорганических композиционных материалов, обеспечивающих синергетический антибактериальный эффект [2].

В работе исследованы закономерности формирования комплексов нанокompозитов альгинат-серебро с антибиотиком энрофлоксацином (ЭФ), изучена их антимикробная активность на штаммах псевдомонад, выделенных от рыб с симптомами заболеваний и депонированных в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Используя подходы «зеленой химии» путем химического восстановления нитрата серебра альгинатом натрия, синтезированы агрегативно устойчивые, отрицательно заряженные (<50 мВ) нанокompозиты Alg1-Ag и Alg10-Ag (с содержанием альгината соответственно 1 мг/мл и 10 мг/мл, серебра – 0,3 мг/мл) сферической формы с размером частиц до 20 нм. Показано, что эффективность связывания антибиотика с наночастицами Alg-Ag зависит от соотношения компонентов в реакционной смеси, типа используемого нанокompозита и варьируется от 8 до 28 % (см. рисунок, а, б). Максимальное количество ЭФ, связанного в комплекс, составляет ~1 мг на 1 мг Alg и может быть достигнуто при соотношении ЭФ:Alg = 7,5 и 10 в случае Alg10-Ag и Alg1-Ag, соответственно.

Изучение антимикробной активности комплексов Alg-Ag/ЭФ с помощью диско-диффузионного метода показало, что они подавляют рост тест-культур псевдомонад *Pseudomonas plecoglossicida* БИМ В-1257, *P. putida* БИМ В-1724, *P. putida* БИМ В-1741, *P. protegens* № 41-2, выделенных из водной среды или от рыб с симптомами заболеваний. Комплекс Alg10-Ag/ЭФ оказывал более выраженное антибактериальное действие по сравнению с Alg1-Ag/ЭФ (диаметр зоны задержки роста бактерий варьировал в пределах 20–25 и 14–20 мм соответственно).



Эффективность включения энрофлоксацина (*a*, *б*) и емкость (*в*, *г*) для комплексов Alg1-Ag/ЭФ (*a*, *в*) и Alg10-Ag/ЭФ (*б*, *г*)

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор X21APM-001).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome / T. Pulingam [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2022. – Vol. 170. – P. 106103.
2. Preparation and Properties of Complexes Based on Chitosan-Ag Nanocomposite and Cephalosporin Antibiotics / A.N. Kraskouski [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2022. – Vol. 58, № 2. – P. 136–142.

Плазмидные векторы для маркирования клеток грамотрицательных бактерий

Охремчук А.Э., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: akhremchuk@bio.bsu.by*

Флуоресцентные белки широко используются для маркирования клеток бактерий. Свойство автофлуоресценции может быть использовано для оценки выживаемости и распространения бактерий в природном или модельном биотопе. В качестве средств доставки репортерных конструкций могут использоваться как автономные векторы, так и интегративные конструкции. Встроенный в хромосому маркирующий ген стабильно наследуется, а конститутивная экспрессия с небольшого количества копий гена не создает значительной нагрузки на метаболизм клетки.

Плазмидные векторы, описанные в работе Даценко и Ваннера [1], позволяют проводить направленные инсерции в различные локусы генома бактерий *Escherichia coli*. При этом наличие во вставке сайтов для сайт-специфической рекомбиназы F₁r (FRT-последовательностей) обеспечивает возможность исключения маркера устойчивости к антибиотику из измененного локуса.

Целью работы являлось получение производных плазмиды pKD13, несущих репортерную кассету, которая обеспечивает экспрессию гена *sfgfp* (ген флуоресцентного белка superfolder GFP). После исключения кассеты устойчивости к антибиотику в измененном локусе остается шрамовая последовательность и репортерная кассета P_{serA(PSI)}-*sfgfp*, что позволяет маркировать клетки бактерий флуоресцентным белком superfolder GFP. Репортерную кассету P_{serA(PSI)}-*sfgfp* получали с помощью амплификации фрагмента плазмиды pDG1731_PSI_sfGFP [2]. Вектор pKD13 линейаризовали по сайту HincII, после чего проводили лигирование вектора и репортерной кассеты. Продукты лигирования подвергали рестрикции с использованием Sall, после чего проводили трансформацию клеток *E. coli* CC118 λ pir. В результате получены плазмиды pKD13A и pKD13D, которые отличаются направлением вставки репортерной кассеты (рис. 1).

Кроме того, проведена работа по замене гена неомицинофосфотрансферазы вектора pKD13 на ген хлорамфениколацетилтрансферазы или ген, определяющий синтез белка эффлюкса тетрациклина. Для этого проводили амплификацию основы плазмиды pKD13 с использованием фосфорилированных на 5'-конце олигонуклеотидных праймеров. Донорами кассет устойчивости к хлорамфениколу и тетрациклину служили плазмиды pCP20 и pACYC184 соответственно. Последовательности кассет устойчивости к антибиотикам получали

путем ПЦР. Проводили лигирование основы плазмиды rKD13 с касетой антибиотикорезистентности, после чего продуктами лигирования трансформировали клетки *E. coli* CC118 λ rig и проводили отбор на селективных средах. Таким образом получены производные от rKD13 плазмиды pFRTcat и pFRTtet (рис. 2).

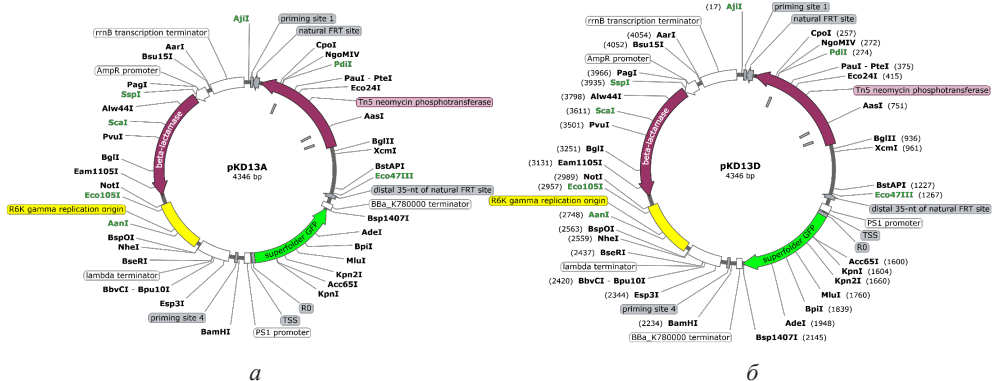


Рис. 1. Карты плазмидных векторов rKD13A (а) и rKD13D (б)

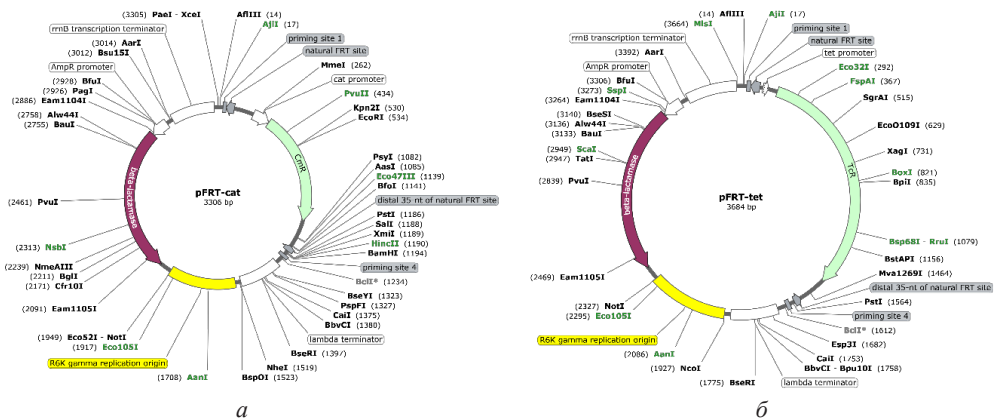


Рис. 2. Карты плазмидных векторов pFRT-cat (а) и pFRT-tet (б)

Полученные в ходе работы векторы rKD13A и rKD13D должны позволить проводить инсерцию касет устойчивости к антибиотику и репортерного гена в целевые локусы генома *E. coli* и других энтеробактерий.

Плазмиды pFRT-cat и pFRT-tet позволяют расширить инструментарий для направленного мутагенеза бактерий, например, снимая ограничения в случае, если клетки бактерий реципиентного штамма устойчивы к канамицину. Кроме того, появляется возможность параллельного внесения инсерций в несколько локусов.

Список использованных источников

1. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6640–6645.
2. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis* / S. Guiziou [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44, № 15. – P. 7495–7508.

Антагонистический потенциал актиномицета *Streptomyces* sp. AP22, выделенного из почвы Ахштырского ущелья

Петрякова А.Д.¹, Никандрова А.А.^{1,2}, Лукьянов Д.А.², Закалюкина Ю.В.^{3,2},
Бирюков М.В.^{1,2}

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, электронный адрес: g.greysilver@yandex.ru

² Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Факультет почвоведения, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В последние десятилетия все более остро проявляется проблема распространения мультирезистентности среди патогенных микроорганизмов. Актуальной задачей биологии и медицины на данный момент является поиск новых молекул с новыми механизмами антибактериального действия, к которым патогены не смогут быстро вырабатывать иммунитет.

Основными стратегиями поиска новых антибиотиков являются: разработка высокопроизводительных платформ скрининга и расширение круга поиска продуцентов антибиотиков. При этом наиболее перспективными объектами для исследования остаются актиномицеты, а также особый интерес представляет выделение новых штаммов из ранее малоизученных экосистем.

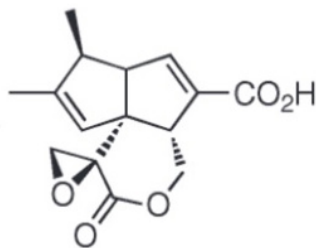
Исследуемый штамм *Streptomyces* sp. AP22 был выделен из посева почвенной пробы, отобранной в Ахштырском ущелье, Краснодарский край, Россия. Данная почва представляет интерес из-за необычного комплекса условий: первичного почвообразовательного процесса и обедненности органическими веществами за счет отсутствия растительности.

По комплексу морфологических свойств *Streptomyces* sp. AP22 – типичный представитель своего рода. Характеризуется выраженным субстратным и воздушным мицелием и микроморфологией колоний (см. таблицу).

С помощью методов глубинного культивирования с последующей твердофазной экстракцией, высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии было установлено, что активным веществом исследуемого штамма является антибиотик пенталенолактон (см. рисунок).

Характеристики *Streptomyces* sp. AP22

Признак	Плотные питательные среды		
	ISP2	ISP3	ISP4
Рост	+	+	+++
Цвет воздушного мицелия	Белый	Белый	Белый
Цвет субстратного мицелия	Бурый	Бурый	Бурый
Наличие растворимого пигмента	+	–	–
Форма цепочек спор	S (спиральные)		



Структурная формула пенталенолактона

Данный сесквитерпеноидный антибиотик специфически и необратимо ингибирует глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH), являющуюся ферментом гликолиза [1]. Согласно литературным данным, этот фермент также вовлечен в различные механизмы антибактериальной устойчивости и формирования биопленок. Исследуемое соединение ингибирует рост тест-штамма *Escherichia coli* BW22113 с нокаутированным 69 нт *lptD* гена, нарушающим целостность клеточной мембраны, а также обладает цитотоксическим эффектом [2]. Цитотоксические свойства затрудняет перспективы применения пенталенолактона для антимикробной терапии, однако данное вещество может быть использовано для химиотерапии злокачественных новообразований.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта РНФ 22-24-00278.

Список использованных источников

1. A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic pentalenolactone in *Streptomyces avermitilis* / C.N. Tetzlaff [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, № 19. – P. 6179–6186.
2. Inhibitory effect of pentalenolactone on vascular smooth muscle cell proliferation / M. Ikeda [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2001. – Vol. 411, № 1–2. – P. 45–53.

Подходы к выделению антимикробных пептидов микробного и растительного происхождения

Рогожин Е.А.

Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург – Пушкин, Россия*

*Институт биологии внутренних вод РАН, Ярославская область, Борок, Россия,
электронный адрес: rea21@list.ru*

Поиск новых биологически активных соединений природного происхождения не теряет своей актуальности ввиду потенциальной возможности выявления молекул, обладающих более выраженной функциональностью. Выявление новых антимикробных соединений, в частности, полипептидной природы, является крайне важным ввиду перспективы последующего их применения сразу в нескольких отраслях народного хозяйства – медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Микроорганизмы, растения и беспозвоночные являются основными источниками антимикробных полипептидов; при этом первым двум группам в большинстве случаев присуще их значительное разнообразие в рамках одного конкретно взятого организма.

Существует множество схем выделения антимикробных пептидов из микроорганизмов и растений, которые преимущественным образом основаны на сочетании методов экстракции и фракционирования методами жидкостной хроматографии. Нами предложены две универсальные схемы выделения антимикробных соединений пептидной природы из растений [1] и микроорганизмов [2].

В первом случае упор делается на анализе секретируемых молекул, соответственно, трехстадийный алгоритм фракционирования включает в себя концентрирование вещества методом гидрофобной хроматографии низкого давления с последующей жидкофазной экстракцией не связавшейся с неподвижной фазой колонки культуральной жидкости органическим растворителем, не способным смешиваться с водной средой (как правило, этилацетатом или н-бутанолом) [3].

Финальный этап получения индивидуальных молекул представляет собой аналитическую или полупрепаративную обращенно-фазовую ВЭЖХ. В случае растений речь идет о внутриклеточной локализации искомым пептидов, следовательно, в результате механического измельчения и экстракции водным, водно-кислотным или солевым буфером с последующим обогащением путем переосаждения избытком полярного органического растворителя (ацетона, изопропанола) получаем раствор, который подвергается процедуре

обессоливания методом твердофазной экстракции среднего давления на гидрофобном сорбенте и двух/трехстадийной сепарации методами жидкостной хроматографии, включающей в себя разделение по заряду (катионообменная хроматография), молекулярным массам (гель-проникающая хроматография) и гидрофобности (обращенно-фазовая ВЭЖХ) [1, 4].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-44-10 021.

Список использованных источников

1. Barashkova, A.S. Isolation of antimicrobial peptides from different plant sources: Does a general extraction method exist? / A.S. Barashkova, E.A. Rogozhin // BMC Plant Methods. – 2020. – Vol. 16. – P. 143.
2. Novel Peptide Antibiotic Produced by *Streptomyces roseoflavus* Strain INA–Ac–5812 with Directed Activity against Gram-positive Bacteria / A.S. Vasilchenko [et al.] // Front. Microbiol. – 2020. – Vol. 11. – P. 556 063.
3. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812 / О.А. Лапчинская [и др.] // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42, № 6. – С. 732–740.
4. Nigellothionins from Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Demonstrate Strong Antifungal and Cytotoxic Activity / A.S. Barashkova [et al.] // Antibiotics (Basel). – 2021. – Vol. 10. – P. 166.

Перспективы использования электродиализа в процессе получения ферментного препарата глюкозооксидазы

Семашко Т.В.¹, Жуковская Л.А.¹, Никулина О.К.², Яковлева М.Р.²,
Колоскова О.В.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tsemashko@mbio.bas-net.by

²Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по продовольствию», Минск, Беларусь

Ферменты – уникальные биокатализаторы, выполняющие важную роль в процессах жизнедеятельности организмов и широко используемые в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Одним из практически значимых ферментов является глюкозооксидаза (β -D-глюкозо:O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) – ФАД-содержащий фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до D-глюконо-1,5-лактона и пероксида водорода [1, 2].

В лаборатории ферментов Института микробиологии получены высокоактивные продуценты глюкозооксидазы, организовано производство ферментных препаратов, определены аспекты их применения. В настоящее время на основе выпускаемого ферментного препарата разработана технология производства модифицированного глюкозного биоэлектрохимического датчика «Глюкосен» для определения концентрации глюкозы в крови, которая внедрена на ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ». Кроме того, показано, что производимые глюкозооксидазы могут использоваться в составе биосенсоров различного типа для определения глюкозы в биологических жидкостях (крови, моче) и в пищевых продуктах, а также для создания биотопливных ячеек [3].

Учитывая потребность Республики Беларусь в этом практически значимом ферменте, целесообразно проведение исследований по совершенствованию технологии его производства. Трудоемкой и время затратной процедурой в процессе очистки глюкозооксидазы является этап обессоливания.

Цель данной работы – изучить влияние электродиализа на свойства глюкозооксидазы и возможность использования в технологии получения данного ферментного препарата.

Электродиализу подвергали отделенную от мицелия культуральную жидкость *Penicillium adametzii* (рН – 2,41, концентрация сухих веществ – 5,73 %), содержащую внеклеточную глюкозооксидазу (14,3 ед/мл). Деминерализацию осуществляли на лабораторной электромембранной установке PEDR-Z (Mega a. s., Чехия) с использованием мембран СМН-PES катионного и АМН-PES анион-

ного типа. Показано, что после электродиализа концентрация сухих веществ уменьшилась более чем в 2 раза, при этом активность глюкозооксидазы снизилась почти на 40 % (8,85 ед/мл). Однако концентрация белка в культуральной жидкости до и после диализа не изменилась, что свидетельствовало об инактивации фермента.

В последующем для характеристики основных физико-химических свойств фермента, культуральные жидкости подвергали концентрированию на ячейке для ультрафильтрации (мембрана с пределом задержания 10 кДа).

Активность глюкозооксидазы в концентрате, полученном из культуральной жидкости, подвергнутой электродиализу, составила 13 828,8 ед. (111 % от концентрата с недеминерализованным ферментом (контроль)). Это говорит об обратимости процесса инактивации и возможности использования электродиализа для обессоливания ферментного препарата.

Анализ влияния кислотности среды (рН 2,0–12,0) на активность глюкозооксидазы, подвергнутой электродиализу, показал, что максимальная каталитическая активность фермента не отличалась от контроля и проявлялась при рН 5,0 и 7,0.

Что касается рН-стабильности фермента, то недеминерализованный фермент сохранял почти 100%-ную активность в диапазоне рН 3,0–7,0 в течение 5 мин. Через 24 ч инкубации в буфере 100%-ная активность наблюдалась при рН 4,0–6,0, а при рН 7,0 остаточная активность составила 36,1–45,2 %. Дальнейшее увеличение показателя рН приводило к резкой инактивации фермента. Аналогичная картина наблюдалась и после диализа. Однако здесь по истечении 24 ч при рН 2,0–6,0 сохранялось 65,1–93,7 % глюкозооксидазной активности, а резкая инактивация фермента происходила при рН 7,0 и выше.

Анализируя термостабильность образцов ферментных препаратов, следует отметить, что при инкубировании глюкозооксидаз в течение 1 ч при 20–60 °С значительных отличий в опыте и в контроле не обнаружено (сохранение практически 100%-ной активности при 20–40 °С и 60,3–76,7 % при 50 °С).

Таким образом, показана возможность использования электродиализа в процессе получения ферментного препарата глюкозооксидазы для его очистки (обессоливания).

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ № Б21АРМ-021.

Список использованных источников

1. Glucose oxidase – An overview / B. Sandip [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2009. – Vol. 27. P. 489–501.
2. Wong, C.M. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications / C.M. Wong, K.H. Wong, X.D. Chen // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 78, № 6. – P. 927–938.
3. Семашко, Т.В. Некоторые аспекты применения глюкозооксидаз *Penicillium adametzii* и *Penicillium funiculosum* / Т.В. Семашко, Р.В. Михайлова // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов : сб. науч. тр. – М., 2016. – С. 110–121.

Процессы микробного синтеза наночастиц и их стабилизации как основа технологий получения новых наноматериалов

Семашко Т.В.¹, Жуковская Л.А.¹, Пригодская В.И.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tsemashko@mbio.bas-net.by

²Биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, Беларусь

Нанотехнологии проникли во все сферы человеческой деятельности, они стали неотъемлемой частью аналитической биотехнологии, одной из главных задач которой является разработка технологий получения новых наноматериалов [1]. Особый интерес представляют наночастицы металлов (серебра, меди, железа и др.). Они нашли широкое применение в биосенсорных технологиях, поскольку обладают хорошими электрокаталитическими свойствами. Биосинтез наночастиц с помощью живых организмов (бактерий, дрожжей, микромицетов) и их метаболитов, так называемые «зеленые» нанотехнологии, рассматривается как альтернатива традиционным химическим методам синтеза наноматериалов [2].

Ранее нами были выявлены активные штаммы мицелиальных грибов, характеризующиеся максимальным уровнем образования наночастиц серебра.

Цель работы – определить метаболиты, синтезируемые исследуемыми культурами, которые обеспечивают высокий уровень синтеза наночастиц и их стабилизацию.

Для получения биологически активных метаболитов, грибы выращивали в колбах на жидкой среде Билай с добавлением и без нитрата серебра (0,1 ммоль/л). После отделения мицелия культуральную жидкость грибов концентрировали путем упаривания.

Первоначально нами был проведен анализ способности штаммов мицелиальных грибов, образующих наночастицы серебра, к синтезу нитратредуктаз, поскольку в литературе встречаются противоречивые данные по этому вопросу. Так, Nietzschold с соавторами показал, что синтез наночастиц происходит под действием NADPH без какой-либо необходимости в ферменте нитратредуктазе [3]. Однако ряд исследователей доказали, что восстановление ионов серебра происходит за счет действия фермента нитратредуктазы [4, 5].

Из проверенных 13 штаммов мицелиальных грибов, способных к синтезу наночастиц, относящихся к родам *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Penicillium* все культуры синтезировали внеклеточные нитратредуктазы. Причем для четырех культур (*P. decumbens* F-1, *Ph. chrysosporium* F-110, *Penicillium* sp. 9 R,

Penicillium sp. 6 SHB) характерен конститутивный синтез данного фермента. Максимальный уровень синтеза данного фермента отмечен для грибов вида *F. oxysporum*.

Кроме того, согласно литературным данным в качестве стабилизаторов НЧ могут выступать флавоноиды, которые предположительно включают ионы металлов в хелатный комплекс и восстанавливают их [4, 5]. Детекцию флавиновых соединений осуществляли путем проведения качественной реакции Вильсона и спектрофотометрически в диапазоне длин волн 240–390 нм. В результате исследований концентратов культуральных жидкостей мицелиальных грибов показано, что максимумы поглощения варьировали в диапазоне 320–370 нм. Наиболее высокие показатели поглощения (0,25–0,30 при длинах волн 320–324 нм) характерны для образцов, полученных с использованием *F. oxysporum* F-1, *F. oxysporum* F-447, *Ph. chrysosporium* F-110.

Кроме того, согласно литературным данным в качестве стабилизатора наночастиц может выступать витамин В₂. У исследуемых культур способности синтезировать рибофлавин выявлено не было. Однако в модельных опытах было показано, что витамин В₂ способствует стабилизации наночастиц серебра, уменьшая образование конгломератов.

Таким образом, определены метаболиты (нитратредуктазы, флавоноиды и рибофлавин), обеспечивающие синтез и стабилизацию наночастиц серебра в процессе их образования.

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ № Б21УЗБГ-018.

Список использованных источников

1. Определение нанотехнологии согласно «Концепции развития в Российской Федерации работ в области нанотехнологий на период до 2010 года» [Электронный ресурс] / Нанотехнологическое общество России. – 2009. – Режим доступа: http://ntsr.info/nanoworld/simple/index.php?ELEMENT_ID=1442. – Дата доступа: 25.02.2017.
2. Биосинтез наночастиц серебра и меди мицелиальными грибами / Т.В. Семашко [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси ; редкол.: Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2021. – Т. 13. – С. 118–130.
3. Does nitrate reductase play a role in silver nanoparticle synthesis? Evidence for NADPH as the sole reducing agent / S. Hietzschold [et al.] // Chem. Eng. – 2019. – Vol. 7. – P. 8070–8076.
4. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains / N.J. Durán [et al.] // Nanobiotechnol. – 2005. – Vol. 3:8. doi: 10.1186/1477-3155-3-8
5. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃ / S.A. Kumar [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2007. – Vol. 29. – P. 439–445.

Выделение фосфатсолюбилизирующих бактерий, продуцирующих индолил-3-уксусную кислоту

Федоренчик А.А.¹, Федосова А.А.², Алещенкова З.М.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: fedorenchik0aa@gmail.com

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Использование микроорганизмов для стимуляции роста и развития растений предполагает выделение из ризосферы и эндосферы растений микроорганизмов, обеспечивающих элементами минерального питания и синтезирующих фитогормоны. Гетероауксин (индолил-3-уксусная кислота, ИУК) – наиболее часто встречающийся в природе растительный гормон класса ауксинов, производное индола. Рядом исследователей установлено, что ИУК синтезируется как симбиотическими бактериями, так и ассоциативными стимулирующими рост растений ризобактериями, а также свободноживущими микроорганизмами [1, 2].

Цель работы – выделение фосфатсолюбилизирующих бактерий, увеличивающих обеспеченность растений доступным фосфором, синтезирующих ИУК.

Выделение и отбор активных фосфатмобилизирующих бактерий из дерново-подзолистой почвы проводили по способности изолятов солюбилизовать фосфаты кальция и образовывать зоны «гало» [3].

Среди выделенных изолятов отобраны 30 культур, образующих зоны «гало» размером от 8 до 28 мм, для которых индекс растворимости фосфатов кальция составил от 1,17 до 3,17 (рис. 1).

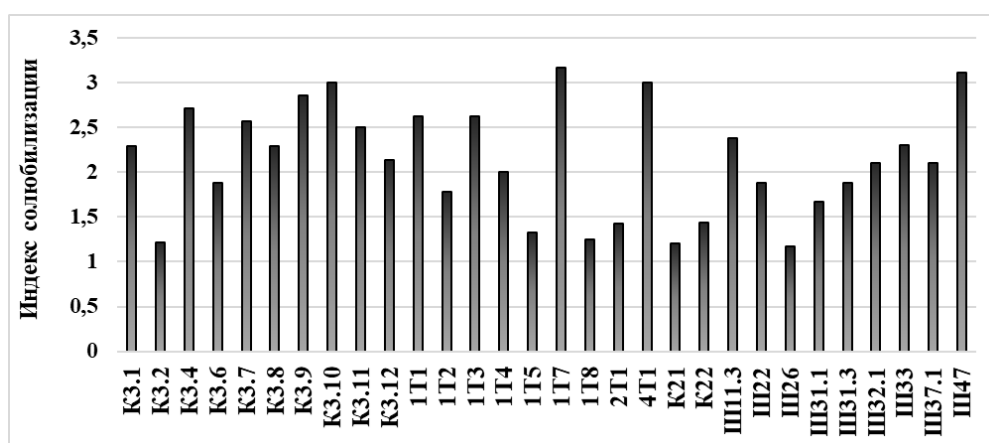


Рис. 1. Индекс солюбилизации фосфата кальция изолятами бактерий

Количественное определение ИУК, продуцируемой изолятами фосфатсолюбилизирующих бактерий, проводили спектрофотометрически при 530 нм на спектрофотометре UV-VIS PB 2201 [4].

Максимальное количество ИУК было обнаружено в культуральной жидкости изолятов К3.10 и 2Т1 (270 и 280 мкг/мл соответственно) (рис. 2).

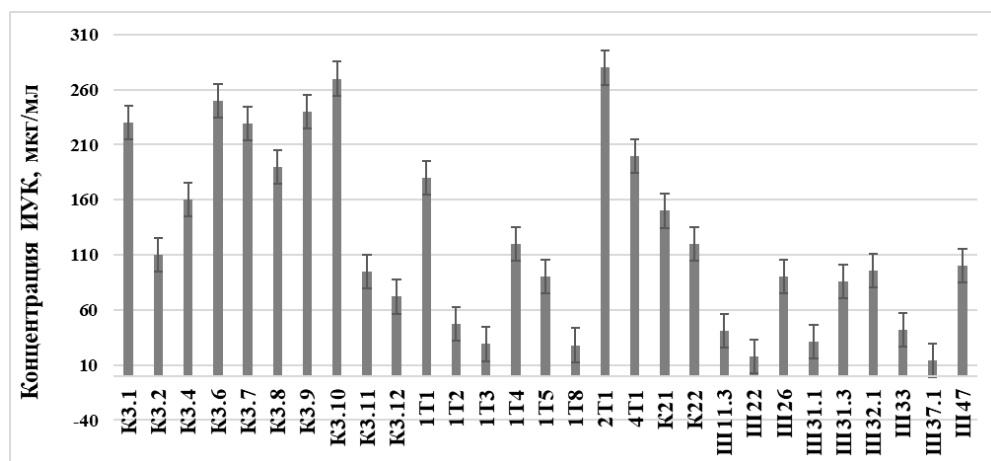


Рис. 2. Концентрация индолил-3-уксусной кислоты, продуцируемой выделенными фосфатсолюбилизирующими изолятами

Все отобранные изоляты фосфатсолюбилизирующих бактерий были способны продуцировать ИУК. На основании полученных данных были отобраны 7 изолятов с наибольшим индексом фосфатсолюбилизации, продуцирующих гетероауксин. Данные изоляты перспективны для использования в качестве основы микробных препаратов, стимулирующих рост и развитие растений.

Список использованных источников

1. Цавкелова, Е.А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е.А. Цавкелова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
2. Влияние продуцирующих индол-3-уксусную кислоту бактерий *Azotobacter chroococcum* 66 и *Pseudomonas putida* nbr9 на термоустойчивость проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L) / Ю.А. Мацкова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7 (ч. 4). – С. 682–686.
3. Муромцев, Г.С. Методы изучения растворения фосфатов кальция микроорганизмами / Г.С. Муромцев // Микробиология. – 1957. – Т. 26, № 2. – С. 172–178.
4. Gordon, S.A. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid / S.A. Gordon, R.P. Weber // Plant physiology. – 1951. – Vol. 26, № 1. – P. 192–195.

Вторичные метаболиты морского гриба *Penicillium* sp. 1901NT-2.53.1

Хмель О.О.¹, Phan Thi Noai Trinh², Юрченко Е.А.³, Юрченко А.Н.³

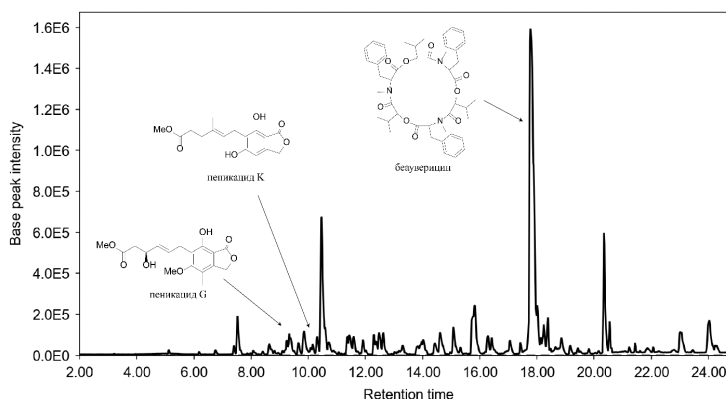
¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²Nhatrang Institute of Technology Research and Application,
Vietnam Academy of Science and Technology, Нячанг, Вьетнам

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, Россия,
электронный адрес: khmel.oo@dvyfu.ru

Из морских грибов ежегодно выделяют уникальные по структуре и биологическому действию соединения, которые не были обнаружены у наземных экоформ, что делает их изучение перспективным направлением получения новых биоактивных вторичных метаболитов [1]. Грибы, ассоциированные с морскими губками, наряду с грибами морских грунтов и морских растений, являются основными продуцентами новых биологически активных соединений [2].

Для поиска перспективных источников биологически активных соединений из образцов губок, собранных в Южно-Китайском море, были выделены штаммы микромицелиальных грибов. Этилацетатные экстракты культур всех выделенных грибов были исследованы методами ТСХ, ВЭЖХ УФ и ВЭЖХ МС. ВЭЖХ МС хроматограмма экстракта гриба *Penicillium* sp. 1901NT-2.53.1, выделенного из морской губки *Cinachyrella* sp., содержала более 10 основных пиков различной интенсивности (см. рисунок). При помощи базы данных GNPS максимальный пик ВЭЖХ МС хроматограммы был соотнесен с известным цикло-депсипептидом беауверицином [3].



ВЭЖХ МС хроматограмма экстракта морского гриба *Penicillium* sp. с идентификацией выделенных соединений

В результате хроматографического разделения из экстракта были выделены известные соединения пеникацид G и пеникацид K. Структуры выделенных соединений были установлены методами одно- и двумерной ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Полученные МС/МС данные позволили соотнести пики ВЭЖХ МС хроматограммы с этими двумя соединениями.

Пеникацид G ранее описывался в качестве метаболита морского гриба *Penicillium parvum* (губка, Южно-Китайское море) [4], а пеникацид K является промежуточным соединением при синтезе микофеноловой кислоты [5].

По данным молекулярного докинга, проведенного с помощью сервера SwissDock, эти соединения могут образовывать комплексы с инозин-5'-монофосфат дегидрогеназой 2 (IMDH2) подобно микофеноловой кислоте, для которой этот фермент является мишенью при иммуносупрессивном и противоопухолевом действии, соответственно, пеникоциды G и K могут демонстрировать подобную активность.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

Список использованных источников

1. Marine-Derived Fungi in Korea / Y.M. Kwon [et al.] // Ocean Sci. J. – 2021. – Vol. 56, № 1. – P. 342–359.
2. Marine natural products / A.R. Carroll [et al.] // Nat. Prod. Rep. – 2021. – Vol. 38, № 2. – P. 362–413.
3. Global Natural Products Social Molecular Networking [Electronic resource]. – Mode of access: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp?redirect=auth>. – Date of access: 31.03.2023.
4. Penicacids E-G, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium parvum* HDN17-478 / X.H. Chen [et al.] // Chin. J. Nat. Med. – 2020. – Vol. 18, № 11. – P. 850–854.
5. A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates / R.E. Canonica [et al.] // Pergamon Press. – 1972. – Vol. 28. – P. 4395–4404.

Конструирование системы редактирования геномов бактерий на основе системы CRISPR/Cas9 *Streptococcus thermophilus*

Хюппенен Е.Д.¹, Охремчук Е.В.², Валентович Л.Н.²

¹Биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, электронный адрес: khuppenenevgeniya@gmail.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Метод редактирования генетической информации с помощью CRISPR/Cas9 системы II типа был разработан в 2012 году и с тех пор зарекомендовал себя как один из самых эффективных инструментов в молекулярной генетике. Метод основан на использовании программируемой эндонуклеазы Cas9, которая вносит разрыв в участке генома, соответствующем последовательности, находящейся в составе вспомогательной молекулы РНК. Редактирование генетической информации происходит в процессе устранения повреждений, так как в процессе гомологичной рекомбинации возможно достраивание последовательности на матрице введенного в клетку шаблона [1].

Современные системы редактирования на основе CRISPR/Cas9 часто разделены на 2 плазмиды. Один из векторов содержит единую направляющую РНК (енРНК) с сайтами рестриктазы IIS типа для вставки целевой последовательности. Ген *Cas9* помещается в малокопийную плазмиду, так как высокая концентрация гена эндонуклеазы угнетает рост клеток. Существуют векторные системы редактирования на основе ряда вариантов белка Cas9, в том числе из непатогенного вида бактерий *Streptococcus thermophilus* [2].

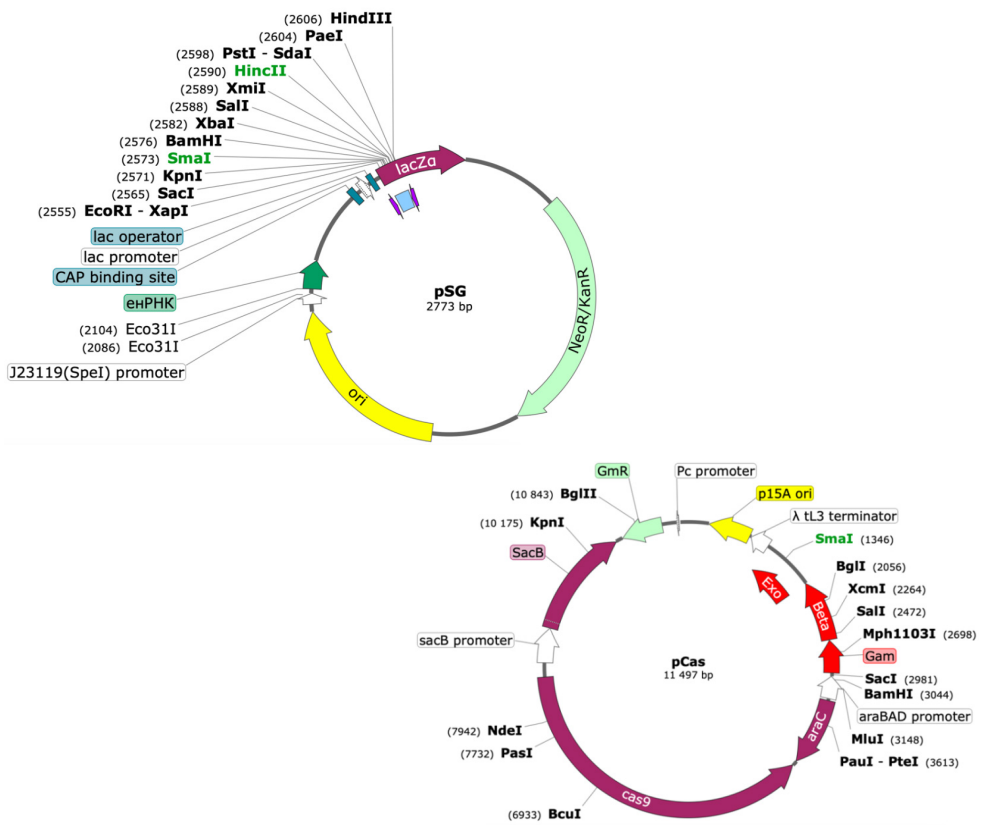
Целью работы является конструирование аналога двухплазмидной системы редактирования бактериальных геномов [1], используя компоненты CRISPR/Cas9 системы типа IIA из генома *S. thermophilus*.

Из числа штаммов Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов с помощью ПЦР-анализа был отобран штамм *S. thermophilus* БИМ В764, который послужил донором компонентов системы. Референсная последовательность генома в базе данных NCBI, а также тип системы были подтверждены путем секвенирования амплифицированного участка гена *Cas9*. В ходе работы методом перекрывающейся ПЦР будет создана плаزمида рSG путем вставки в многокопийный вектор рК18 последовательности енРНК, состоящей из синтетического промотора P_{J23119} и двух синтезированных *de novo* сайтов рестриктазы Eco31I, а также амплифицируемой из генома *S. thermophilus* вспомогательной транскрибирующей РНК.

Аналогичным методом ведется работа по сборке плазмиды рCas (см. рисунок), содержащей малокопийную точку начала репликации плазмиды р15A, ген *sacB* и ген устойчивости к гентамицину, полученные из вектора рJQ200KS;

рекомбиназную систему λ RED из вектора pKD46; а также ген *cas9* и его терминатор, амплифицированные из генома *S. thermophilus*.

Система будет использоваться для множественного геномного редактирования клеток *E. coli* и иных бактерий группы кишечной палочки (генных нокаутов, гомологичной рекомбинации). Также будет проведена работа по внедрению в плазмиду pSG последовательности, обеспечивающей ее самоэлиминацию после выполнения заданной функции.



Карта плазмид pSG и pCas

Список использованных источников

1. A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *Escherichia coli* / Q.I. Li [et al.] // ABBS. – 2021. – Vol. 53, № 5. – P. 620–627.
2. Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9 / A.S. Meijers [et al.] // Tuberculosis. – 2020. – Vol. 124. – P. 101983.

Создание генетической конструкции для экспрессии рекомбинантной кератиназы *Bacillus licheniformis* в условиях «холодового шока»

Чиндарева М.А., Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: maryja.che@gmail.com

Кератиназы представляют собой протеолитические ферменты, способные гидролизовать пептидные связи в различных кератиновых субстратах (перья, волосы, шерсть) с образованием таких хозяйственно ценных продуктов, как пептиды и аминокислоты [1]. В настоящее время, описано множество микроорганизмов, обладающих кератинолитической активностью, наиболее изученными среди которых являются представители рода *Bacillus*. Однако синтез данного фермента у природных штаммов недостаточно эффективен, поэтому представляется целесообразным использование рекомбинантных штаммов – сверхпродуцентов кератиназ [2].

Целью данной работы стало получение генетической конструкции для экспрессии гена кератиназы *B. licheniformis* в условиях «холодового шока».

На основании последовательности гена *kerA*, депонированной в базе данных GenBank (№ S78 160), были разработаны праймеры для выделения и встраивания нуклеотидной последовательности, кодирующей кератиназу, в экспрессионный вектор pCold. В данной плазмиде целевой ген находится под контролем промотора белка А холодового шока (*cspA*), что позволяет индуцировать синтез белка при низких температурах (15 °С). Объединение нуклеотидных последовательностей гена и вектора осуществляли методом продолжительной перекрывающейся полимеразной цепной реакции (ПП-ПЦР) [3]. Трансформацию клеток *E. coli* BL21 (DE3) ПП-ПЦР смесью проводили методом электропорации. Для подтверждения наличия вектора, несущего ген *kerA*, проводили скрининг полученных трансформантов методом ПЦР с использованием праймеров к промотору *cspA* и целевому гену. Протеолитическую активность колоний, содержащих конструкцию pCold_kerA, проверяли на чашках Петри с питательной средой, содержащей 1 % сухого молока.

В результате были отобраны колонии, несущие целевую конструкцию для экспрессии рекомбинантной кератиназы в клетках *E. coli* в условиях «холодового шока».

Спісок іспользаваных істочнікаў

1. Li, Q. Structure, Application, and Biochemistry of Microbial Keratinases / Q. Li // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 674345.
2. Multifarious revolutionary aspects of microbial keratinases: an efficient green technology for future generation with prospective applications / F. Akram [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2022. – Vol. 29, № 58. – P. 86913–86932.
3. Quan, J. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.

Поиск аскомицетовых дрожжей из коллекции БРЦ ВКПМ, обладающих наибольшей киллерной активностью

Шагалова В.А.¹, Вустин М.М.², Машенцева Н.Г.¹

¹ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,
Москва, Россия,

электронный адрес: shagalovalira@gmail.com

²БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика

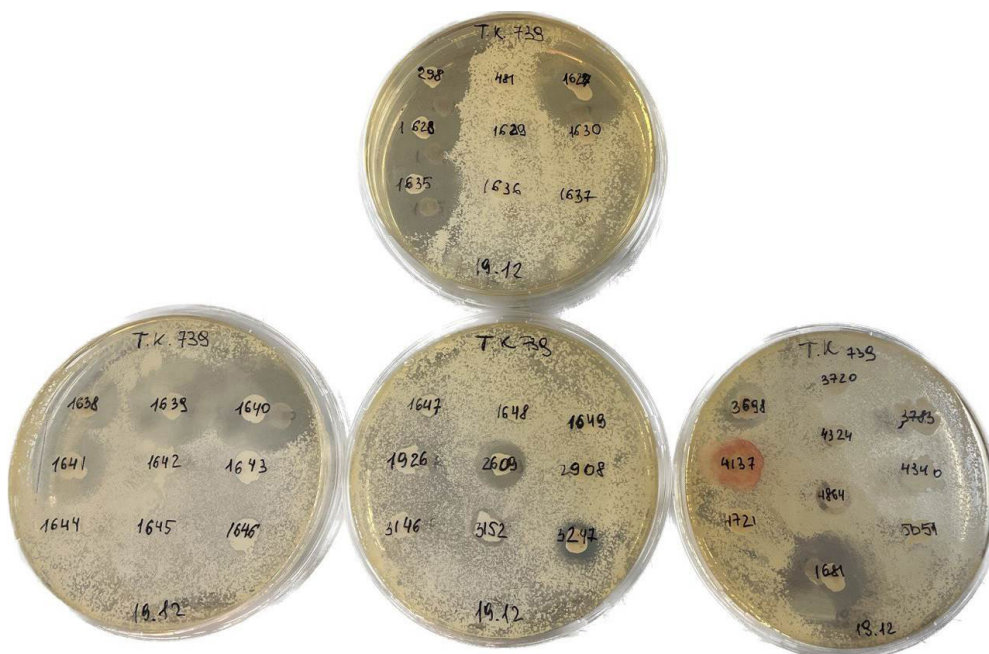
Традиционно дрожжи применяются в пищевой промышленности при производстве хлеба, вина, пива и других пищевых продуктов. Большим спросом пользуется получение ферментных препаратов, органических кислот, полисахаридов, многоатомных спиртов, витаминов и витаминных добавок с помощью дрожжей. Помимо прочего, данные микроорганизмы обладают выраженной киллерной активностью в отношении родственных и других видов.

Впервые киллерные токсины (КТ) или микоцины были обнаружены у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в 1960-х годах и с тех пор выявлены и у других представителей одноклеточных грибов. КТ дрожжей представляют собой соединения белковой природы, различающиеся как по молекулярной массе, так и по механизму действия [1]. КТ можно рассматривать как аналог антибиотикам, продуцируемыми отдельными штаммами дрожжей в конкурентной борьбе за субстрат с другими дрожжами. В научной литературе также отмечена зависимость активности КТ от ряда физиологических факторов, включая pH среды, температуру, осмотическое давление и источники азота [2].

На сегодняшний день существует множество исследований, доказывающих эффективность КТ дрожжей при выработке высококачественных сортов вина, увеличении сроков годности некоторых продуктов питания, а также в качестве средств профилактики и лечения грибковых заболеваний, включая кандидозы [1].

На базе БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика проводился скрининг дрожжей, обладающих киллерной активностью с целью поиска наиболее активных штаммов. Тест осуществлялся на агаризованной питательной среде YPD с pH = 4,0–4,5. Для исследования использовали суточные культуры дрожжей. Скрининг осуществляли методом культуры на культуру. Для этого на чашки с засеянными «газоном» тест-культурами по периметру размещали бактериальной петлей биомассу исследуемых культур дрожжей. В качестве тест-культур были взяты дрожжи *Candida nitratophila* (Y-2123) и *Candida tenui* (Y-739), обладающие сверхчувствительностью по отношению к большому количеству КТ различных дрожжей.

Инкубирование проводили в течение 48 ч при температуре 30 °С. По истечении времени инкубации измеряли диаметр зон подавления роста тест-культур.



Штаммы *Schwaniomyces occidentalis* (Y-298, Y-1627, Y-1638, Y-1639, Y-1640, Y-1641),
Cyberlindera mrakii (Y-2609, Y-1209, Y-1211), *Metschnikowia pulcherima* (Y-3698),
Debaryomyces hansenii (Y-1681)

Скрининг показал, что максимальной киллерной активностью обладают штаммы дрожжей видов *Schwaniomyces occidentalis* (Y-298, Y-1627, Y-1638, Y-1639, Y-1640, Y-1641), *Cyberlindera mrakii* (Y-2609, Y-1209, Y-1211), *Metschnikowia pulcherima* (Y-3698), *Debaryomyces hansenii* (Y-1681), *Wickerhamomyces anomalus* (Y-1006, Y-1182, Y-1817, Y-2085, Y-2096, Y-2100, Y-3739, Y-4562, Y-4977). Зоны подавления роста обеих тест-культурах составляли от 10 до 29 мм (см. рисунок).

Список использованных источников

1. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications / G.L. Liu [et al.] // Crit Rev Biotechnol. – 2015. – Vol. 35 (2). – P. 222–234.
2. Chen, P.H. Screening and Identification of Yeasts Antagonistic to Pathogenic Fungi Show a Narrow Optimal pH Range for Antagonistic Activity / P.H. Chen, J.Y. Chou // Pol. J. Microbiol. – 2017. – Vol. 66 (1). – P. 101–106. doi: 10.5604/17331331.1234997. PMID: 29359688

Выделение и характеристика галотолерантных бактерий

Шелоник М.А.¹, Гуляева Д.Е.², Леонович С.И.², Сидоренко А.В.^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Бактерии, способные развиваться в присутствии высоких концентраций солей, называемые галофильными и галотолерантными, являются объектами пристального внимания исследователей. Данные микроорганизмы выработали ряд уникальных адаптивных механизмов, позволяющих существовать в гиперсоленых условиях обитания и обеспечивающих устойчивость к экстремальным температурам, рН среды и другим негативным воздействиям. Благодаря низкой потребности в питательных веществах и высокой адаптивности к неблагоприятным условиям, галофильные бактерии рассматриваются как перспективные продуценты биологически активных соединений, таких как гидролитические ферменты, полигидроксиалканоаты, полисахариды. Поэтому их выделение, идентификация и характеристика представляют интерес как для фундаментальной микробиологии, так и для биотехнологических целей.

Из образцов почвы, отобранных вблизи автодороги (г. Минск), а также образцов почвы и воды из технического водоема, отобранных в Старобинском месторождении калийных солей (г. Солигорск), выделены 24 культуры бактерий, растущих на питательной среде с высоким (2–12 %) содержанием хлорида натрия. Установлено, что оптимальная концентрация NaCl для изолятов из почвы, отобранной вблизи автодороги, составляет 4 %, а для изолятов из образцов, отобранных в Старобинском месторождении, данный показатель увеличивается до 6–8 %. Исходя из полученных данных, выделенные бактерии можно отнести к группе слабогалофильных (оптимум 2–5 % NaCl) и умеренногалофильных (оптимум 5–10 % NaCl). Однако, учитывая хороший рост исследуемых культур на среде с низким (0,5 %) содержанием хлорида натрия, их скорее следует рассматривать как галотолерантных.

Проведена видовая идентификация галотолерантных бактерий на основании данных сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Показано, что большинство выделенных культур (25 % от общего количества) являются представителями рода *Staphylococcus*, за ними следуют спорообразующие бактерии родов *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Ornithinibacillus*, что согласуется со сведениями литературы о солеустойчивости этих групп микроорганизмов [1–3]. Видовой состав галотолерантных бактерий включал *Alkalibacterium putridalgalicola*, *Bacillus* sp., *Glutamicibacter* sp., *Glutamicibacter uratoxydans*, *Mammaliococcus lentus*, *Microbacterium keratanolyticum*,

Oceanobacillus oncorhynchi, *Oceanobacillus picturae*, *Ornithinibacillus halophilus*, *Ornithinibacillus* sp., *Psychrobacter alimentarius*, *Serratia* sp., *Sporosarcina aquimarina*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus ureilyticus*, *Virgibacillus halodenitrificans*.

Исследование роста галотолерантных бактерий при разных температурах показало, что 13 изолятов являются мезофилами, растущими в диапазоне температур 18–28 °С, а 11 штаммов способны расти при 4 °С, что позволяет рассматривать их как психротрофов. Следует отметить, что культуры бактерий, устойчивые к более высоким концентрациям соли, были способны расти в более широком диапазоне температур.

Изучена ферментативная активность выделенных культур галотолерантных бактерий. Способность к продукции амилаз выявлена у 3 штаммов, протеаз – 7 штаммов, липаз – 6 штаммов. Необходимо отметить, что среди исследуемых штаммов только 1 обладал комплексной ферментативной активностью. Скрининг изолятов по способности к солюбилизации фосфатов и фиксации атмосферного азота выявил данные свойства у 9 и 8 штаммов, соответственно. При этом 3 штамма обладало как фосфатмобилизующей, так и азотфиксирующей активностью. Способность выделенных штаммов галотолерантных бактерий синтезировать гидролитические ферменты (амилазы, протеазы, липазы), солюбилизировать фосфаты и фиксировать атмосферный азот свидетельствует о потенциальной возможности их использования в биотехнологии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ectoine accumulation in *Brevibacterium epidermis*/ A. Onraedt [et al.] // *Biotechnol. Letters*. – 2004. – Vol. 26, № 19. – P. 1481–1485.
2. Furkan, O. Salt Stress Mitigating Potential of Halotolerant/Halophilic Plant Growth Promoting/ O. Furkan, A. Demirci // *Geomicrobiology Journal*. – 2020. – Vol. 37, № 7. – P. 663–669.
3. Plant growth promoting characteristics of halophilic and halotolerant bacteria isolated from coastal regions of Saurashtra Gujarat / L. Reang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 1–16.

Оценка эффективности осаждения клеток микроорганизмов при их концентрировании путем центрифугирования в условиях биотехнологического производства

Щетко В.А., Романова Л.В., Макаревич О.В., Гапонова И.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

Центрифугирование – один из широко используемых методов в биотехнологии для концентрирования культуральных жидкостей и частичного обезвоживания, при котором разделение веществ основано на разном поведении частиц в центробежном поле [1]. Скорость осаждения клеток зависит не только от центробежного ускорения, но и от их формы, размеров, количества, вязкости суспензии, а также от химической природы и концентрации веществ, растворенных в культуральной жидкости [2]. Указанные факторы являются специфичными для каждой культуры, что требует индивидуального подхода к подбору параметров осаждения клеток [3].

Исследования проводили с различными видами молочнокислых микроорганизмов (*Lactobacillus fermentum*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus casei*), клубеньковыми (*Rhizobium galegae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*) и споровыми бактериями рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*).

В ходе выполнения исследований применялось периодическое глубинное культивирование. Микроорганизмы выращивали на питательных средах различного состава до получения титра КОЕ не менее $1 \cdot 10^9$. Клетки бактерий осаждали с помощью проточной центрифуги с параметрами: 14–15 тыс. об/мин, скорость подачи КЖ 150–250 л/ч. Жизнеспособность бактерий (число колониеобразующих единиц – КОЕ/мл) определяли методом предельных разведений с последующим высевом на агаризованные питательные среды для бацилл и клубеньковых бактерий и в 0,2%-ную агаризованную питательную среду для молочнокислых бактерий.

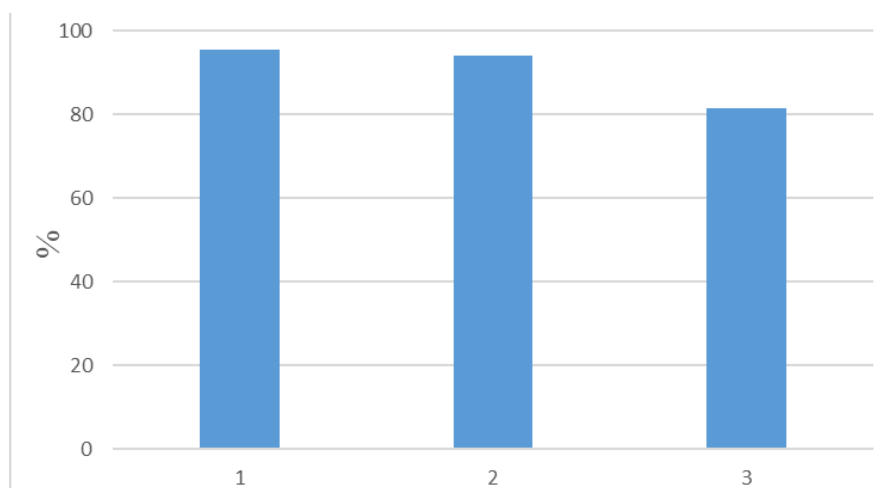
Оценка соотношения титра КОЕ в культуральной жидкости к титру КОЕ в надосадочной жидкости показала потери клеток для молочнокислых микроорганизмов от 1 до 7,5 %, для клубеньковых бактерий от 5 до 7 %. Потери клеток бацилл составили от 17 до 20 %. Процент осаждения клеток исследуемых микроорганизмов показан на рисунке.

Снижение температуры центрифугируемой культуральной жидкости до +4 °С не оказывало существенного влияния на процесс концентрирования.

Следует отметить, что использование центрифуг с периодической загрузкой сопровождалось значительными потерями биомассы в процессе ее выгрузки

ки. Концентрирование же клеток в проточных центрифугах позволяло значительно повысить эффективность процесса.

Таким образом, метод проточного центрифугирования можно считать эффективным при осаждении молочнокислых и клубеньковых бактерий. В то же время использование центрифугирования для бацилл не обеспечивало оптимального выделения биомассы, что связано с высоким содержанием в среде культивирования спор, у которых размеры и вес значительно ниже таковых параметров у клеток.



Эффективность концентрирования клеток различных групп микроорганизмов при центрифугировании: 1 – молочнокислые; 2 – клубеньковые; 3 – споровые

Список использованных источников

1. Безбородов, А.М. Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе // СПб. : Проспект Науки, 2011. – С. 144.
2. Долинов, К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов / К.Е. Долинов // М. : Медицина, 1969. – С. 231.
3. Gilbert, P. Centrifugation injury of Gram-negative bacteria / P. Gilbert, F. Caplan, M. R. W. Brown // J. of Antimicrob. Chemotherapy. – 1991. – Vol. 27, № 4. – P. 550–551.

Биотехнологический потенциал морских грибов-микровицетов

Юрченко А.Н.

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
ДВО РАН Владивосток, Россия,
электронный адрес: yurchant@ya.ru*

Активное изучение фармацевтического потенциала грибов-микровицетов, в том числе морских, началось в первой половине XX века. Одним из ключевых факторов, способствующих продуцированию тех или иных метаболитов, являются особенности природной среды обитания грибов. Несмотря на то, что до сих пор не удалось доказать, что морская среда сама по себе «побуждает» грибы продуцировать уникальные соединения, особенности отдельных морских экосистем, а также малоизученность обитающих там грибов по сравнению с наземными экоформами, позволяют получать «выдающиеся» метаболиты [1].

В лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН грибы, выделенные из различных морских субстратов, изучаются около 25 лет. За этот период были детально изучены биосинтетические способности около 80 штаммов, выделено более 400 индивидуальных соединений, в том числе 185 новых, из них 19 – обладающих антибиотической активностью, 31 – цитотоксической активностью, 14 – цитопротекторной активностью.

Помимо классического исследования метаболитного состава экстрактов грибов в настоящее время также применяется целый комплекс подходов, называемый в англоязычной литературе OSMAC (one strain – many compounds). При этом изменяются физические условия культивирования, состав питательной среды, а также проводится совместное культивирование двух или более штаммов грибов. Реализация этих подходов привела к выделению новых метаболитов, не детектировавшихся в «базовых» условиях. Таким образом были получены более десятка новых соединений, некоторые из которых содержат уникальные для природных соединений структурные фрагменты, а также обладают высокой цитотоксической и антипролиферативной активностями.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

Список использованных источников

1. Yurchenko, A.N. Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies / A.N. Yurchenko, E.V. Girich, E.A. Yurchenko // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19, № 2. – Art. 88.

Секция 3

Биотехнологии для сельского хозяйства

Prospects of *Streptomyces anthocyanicus* strain IPS92w against plant pathogens

Abashina T.N.¹, Polivtseva V.N.¹, Suzina N.E.¹, Noskov A.E.¹, Khodakaramyan G.², Solyanikova I.P.¹

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. G.K. Skryabin RAS, Russia,
e-mail: tnabashina@gmail.com

²Bu-Ali Sina University, Iran

The course towards the biologization of agriculture makes it relevant to search for and develop biological means of plant protection against bacterial and fungal pathogens. *Actinomycetes* are extremely promising – producers of biological compounds of various chemical structures that have antibacterial, antifungal and antitumor effects. Most antibiotics are isolated from actinomycetes of the widespread genus *Streptomyces*.

We have isolated a biotechnologically promising strain of bacteria with high sensitivity to antibiotics, which is an important characteristic of the strain, since it allows the use of whole cells as a biological product that exhibits high antibacterial and antifungal activity against plant pathogens. Based on the analysis of the 16S rRNA, the strain was assigned to *Streptomyces anthocyanicus*.

Evaluation of the antibacterial activity of the strain was carried out according to the ability to form a zone of lysis or growth inhibition. To assess the antagonistic effect on the growth of the test culture, we used: 1) a 5-fold concentrated culture liquid of the strain and 2) an extract obtained by treating the culture liquid with ethyl acetate. The study of antibacterial activity was carried out by the disk method: Petri dishes with nutrient agar medium were inoculated with prepared cell suspensions. Sterile discs made of filter paper were placed on the surface of the agar medium and one of the variants of the studied liquid was applied to them. The results were evaluated after 24–48 h of cultivation at 28 °C by the presence of an inhibition zone around the paper disk. As test cultures, 12 typical model strains of gram-positive and gram-negative bacteria and 9 strains of phytopathogenic fungi were used.

The liquid culture of strain *S. anthocyanicus* IPS92w inhibits the growth of gram-negative bacteria *Aeromonas veronii* and *Pectobacterium carotovorum* B15, gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus sphaericus* and *Kocuria rosea* VKM B-1236, and phytopathogenic fungi *Fusarium avenaceum* F-132 and *Pythium vexans* F-1193. The ethyl acetate extract of the liquid culture *S. anthocyanicus* strain IPS92w has a wider spectrum of suppression of phytopathogens: gram-negative bacteria *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes faecalis* VKM B1518, *Pectobacterium*

carotovorum B15, *Pantoea agglomerans* ATCC 27155, *Pseudomonas aeruginosa* ML 4262, gram-positive bacteria *Arthrobacter* sp. B52, *Bacillus cereus* GAST, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus mycoides* KBA4, *Kocuria rosea* VKMB-1236, *Staphylococcus aureus* St35 and phytopathogenic fungi *Fusarium avenaceum* F-132, *Pythium vexans* F-1193, *Aspergillus unguis* F-1754, *Alternaria brassicicola* F-1864, *Penicillium gladioli* F-2088, *Botrytis cinerea* F-4549, *Pythium ultimum* F-4782.

The *S. anthocyanicus* IPS92w retains its ability to suppress test cultures regardless of the composition of the medium and the mode of presentation of secondary metabolites: culture liquid concentrated 5 times, culture liquid or organic solvent extract.

The conducted studies are the basis for the development of a drug to combat plant diseases caused by phytopathogenic bacteria and fungi.

The work was carried out within the framework of a grant from the Ministry of Higher Education and Science, project N 075-15-2022-1208.

Продуктивность и естественная резистентность кроликов при введении в рацион кормовой добавки ДКМ-С

Авсиевич Е.И.¹, Лойко И.М.¹, Романова Л.В.²

¹УО «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь,
электронный адрес: avsiyevich1993@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Современные подходы к разработке технологий сбалансированного кормления животных в качестве обязательного компонента рациона молодняка рассматривают пробиотические микроорганизмы, прежде всего молочнокислые бактерии (*Lactobacillus acidophilus*), у которых в значительной степени выражены пробиотические свойства [1, 2].

Проведены исследования по изучению эффективности действия сухой добавки ДКМ-С с различными наполнителями в составе кормов на естественную резистентность и иммунологическую реактивность лабораторных животных.

ДКМ-С (добавка кормовая кисломолочная сухая) содержит лиофильно высушенную культуру молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus acidophilus*. В 1 г препарата содержится не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ молочнокислых бактерий.

Для проведения опыта по принципу пар-аналогов подбирали клинически здоровых кроликов калифорнийской породы в возрасте 3 месяцев, живой массой 2750–2950 г, которые были распределены на 4 группы (3 опытные и 1 контрольная) по 4 особи в каждой. Контрольная группа кроликов получала основной рацион, предусмотренный в виварии [3]. Животным первой опытной группы совместно с основным рационом давали ДКМ-С с наполнителем мукой пшеничной, второй опытной группы вводили ДКМ-С с наполнителем глюкозой и животные третьей опытной группы получали дополнительно к рациону ДКМ-С с молочной сывороткой. Исследуемую кормовую добавку ДКМ-С с различными наполнителями смешивали с гранулированным комбикормом и вводили в рацион по 5 г на голову в сутки. Доступ к пище и воде во всех группах животных был свободным, без ограничений. Продолжительность опытного периода составила 30 дней.

Контроль за сохранностью и падежом осуществляли ежедневно.

В результате исследований установлено, что изучаемые биодобавки при длительном использовании в дозах, указанных выше, не оказывали токсического действия на организм. Гибели животных при их использовании в опытных группах выявлено не было. Подопытные животные хорошо переносили ДКМ-С, они были клинически здоровы в течение всего эксперимента, не отмечалось нарушений в поведении, приеме корма и воды аналогично животным

контрольной группы. На протяжении всего опыта животные во всех группах имели хорошую упитанность и удовлетворительное общее состояние.

В результате исследований установлено, что исследуемая кормовая добавка ДКМ-С с различными наполнителями оказала положительное влияние на рост и развитие лабораторных животных. Темпы роста живой массы у кроликов с применением кормовой добавки по окончании опытного периода повышались более интенсивно в сравнении с животными из контрольной группы. Живая масса животных первой опытной группы увеличилась к 30-дневному возрасту на 13,5 %, второй опытной группы – на 17,6 %, третьей опытной группы – на 14,1 % по сравнению с аналогами контрольной группы.

Применение кроликам биологически активных добавок оказало благоприятное влияние на морфологические и биохимические показатели крови, что сопровождалось увеличением количества лейкоцитов на 4,3–5,7 %, количества эритроцитов на 6,5–7,0, гемоглобина на 7,3–10,8, тромбоцитов на 3,6–4,6, снижением концентрации общего билирубина на 11,1–12,9, мочевины – на 9,2–10,8, холестерина – на 9,8–11,3, увеличением содержания глюкозы на 11,2–13,6, общего белка – на 6,9–9,4, альбуминов – на 11,3–13,7, общего кальция, магния и железа – на 16,4, 8,1 и 3,5 % соответственно по сравнению со сверстниками из контрольной группы.

Таким образом, проведение испытаний на лабораторных животных позволило установить, что ДКМ-С является непатогенной и безвредной, способствует повышению обменных процессов, естественной резистентности и сохранности лабораторных животных.

Список использованных источников

1. Панин, А.Н. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных / А.Н. Панин, Н.И. Малик // Ветеринария. – 2006. – № 7.
2. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения/ Н.А. Ушакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 184–192.
3. ГОСТ 33215-2014: Рук. по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. – М. : Стандартинформ, 2016. – Введ. 01.07.2016. – 12 с.

Влияние штаммов бактерий рода *Bacillus* на токсигенный гриб *Fusarium graminearum*

Аллахвердян В.В., Сидорова Т.М., Асатулова А.М.

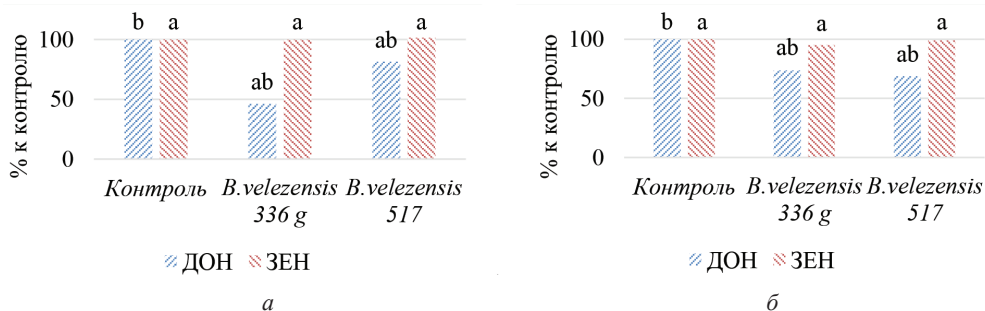
ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»,
Краснодар, Россия,
электронный адрес: lera_arm@mail.ru

Пшеница является одной из важнейших зерновых культур в мире. Заболевания, вызванные грибами рода *Fusarium*, могут ежегодно приводить не только к снижению качества зерна, но и к загрязнению фузариотоксинами которые представляют серьезную угрозу для здоровья человека [1]. Среди микотоксинов гриба *F. graminearum* дезоксиниваленол (ДОН) и зеараленон (ЗЕН) наиболее вредоносны и распространены. Известны биофунгициды на основе бактерий рода *Bacillus*, способные не только ингибировать рост токсигенного гриба, но и сдерживать контаминацию зерна пшеницы микотоксинами.

Бактерии рода *Bacillus* используют различные механизмы для подавления роста *F. graminearum*. Антигрибная активность бактерий зависит от их способности продуцировать биологически активные соединения, особенно липопептиды. Штаммы бактерий *B. velezensis* BZR 336g и *B. velezensis* BZR 517 из биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов», в процессе культивирования при оптимальных условиях синтезируют большое количество разнообразных по структуре метаболитов, среди которых идентифицированы липопептиды сурфактиновой и туриновой природы [2]. Данный факт обнаружен нами как методами ТСХ и биоавтографии, так и ВЭЖХ. Это говорит о том, что оба штамма бактерий имеют необходимые для подавления гриба антагонистические свойства. Результаты, полученные при изучении влияния бактерий *B. velezensis* BZR 336g и *B. velezensis* BZR 517 на рост гриба, позволяют констатировать, что оба исследуемых штамма бактерий в значительной степени проявляют антагонистические свойства, подавляя рост гриба штамма *F.graminearum* 60318.

При изучении влияния культуральной жидкости и супернатанта бактерий *B. velezensis* BZR 336g и *B. velezensis* BZR 517 на накопление микотоксинов штаммом гриба *F. graminearum* 60318 при культивировании на зерне пшеницы *in vitro* наблюдается существенное снижение содержания ДОН при культивировании гриба совместно с жидкой культурой бактерий. Это характерно особенно для штамма *B. velezensis* BZR 336g, когда содержание ДОН уменьшается более чем на 50 %. Содержание ЗЕН оставалось на уровне контроля (культивирование гриба без бактерий).

Влияние супернатанта культуральной жидкости обоих штаммов бактерий также ограничивалось ДОН, при этом содержание ЗЕН снижалось незначительно. Что характерно, содержание ДОН в большей степени уменьшалось под действием супернатанта бактерий *B. velezensis* BZR 517 в отличие от влияния жидкой культуры бактерий. Этот факт, вероятно, связан с особенностями механизма антагонизма бактерий и требует дальнейшего изучения (см. рисунок).



Влияние жидкой культуры (а), супернатанта бактерий (б) рода *Bacillus* на накопление микотоксинов *F.graminearum* 60318 при культивировании на зерне пшеницы *in vitro*. Между вариантами, отмеченными одинаковыми буквами, при сравнении внутри столбцов нет статистически значимых различий по критерию Дункана при уровне вероятности 95 %

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что штаммы бактерий *B. velezensis* BZR 336g и *B. velezensis* BZR 517 подавляют грибок *F. graminearum* и снижают накопление ДОН, при этом влияние на ЗЕН не является существенным. Тем не менее это обстоятельство не умаляет значение исследуемых штаммов бактерий как продуцентов эффективных биофунгицидов против *F. graminearum*.

В исследованиях использована материально-техническая база УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (<https://ckp-rf.ru/catalog/usu/671367>).

Исследования выполнены согласно Государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № FGRN-2022-0005.

Список использованных источников

1. The salt – tolerant phenazine-1-carboxamide – producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NF011 isolated from wheat rhizosphere soil in dry farmland with antagonism against *Fusarium graminearum* / X. Sun [et al.] // Microbiological research. – 2021. – Vol. 245. – P. 126–139. doi: org/10.1016/j.micres.2020.126673
2. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Т.М. Сидорова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – Т. 54. – С. 178–185. doi: org/10.15389/agrobiology.2019.1.178rus

Влияние дрожжевых грибов на физиолого-биохимические параметры листьев укорененных черенков винограда

Волынчук Н.Н.¹, Кабашникова Л.Ф.², Пашкевич Л.В.²

¹Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
электронный адрес: volynchuk.n@mail.ru

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Дрожжевые грибы являются перспективными микроорганизмами для разработки средств биологического контроля в виноградарстве. Одним из показателей эффективности ассоциативного взаимодействия винограда с дрожжевыми грибами являются такие физиолого-биохимические параметры растений, как содержание основных пигментов фотосинтеза, а также активность перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Объектом исследования служили укорененные черенки винограда культурного *Vitis vinifera* сорта Альфа. Для инокуляции были выбраны штаммы дрожжевых грибов, выделенные их разных экониш винограда того же сорта и демонстрирующие наилучшие показатели ингибирования роста фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* БИМ F-609 и *Botrytis cinerea* БИМ F-71. Обработку корней проводили водной суспензией 5 штаммов дрожжей (10^{-6} КОЕ на 1 мл) из расчета 5 мл на растение. Растения выращивали при комнатной температуре в грунте на основе предварительно простерилизованного торфа. Анализ проводили через 1,5 месяца после инокуляции. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой.

Для экстракции пигментов использовали навеску листьев (20–30 мг). Хлорофилл и каротиноиды экстрагировали 99,5%-ным ацетоном в трехкратной повторности. Количество пигментов в экстрактах определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре «Shimadzu UV – 2401PC» (Япония) при трех длинах волн: 662 нм (хлорофилл *a*, Хл *a*), 644 нм (хлорофилл *b*, Хл *b*) и 440,5 нм (каротиноиды). Количество пигментов рассчитывали по формулам А.А. Шлык (1971). Содержание фотосинтетических пигментов выражали в расчете на единицу сырой биомассы листа.

Активность ПОЛ тестировали по количеству образовавшегося стабильного продукта перекисления липидов мембран – малонового диальдегида (МДА), определенного спектрофотометрически по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Навески листьев (0,15 г) в трех повторах для каждого варианта гомогенизировали в 5 мл 5мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К полученному гомогенату добавляли равный объем 0,5 % ТБК в 20 % трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Полученные образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при

3000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта регистрировали фотометрически при 532 нм с учетом неспецифического поглощения при 650 нм на спектрофотометре «Shimadzu-UV 2401 PC» (Япония). Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА с ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при $\lambda = 600$ нм ($1,5 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) составил $1,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ [1].

Достоверность различий средних значений определяли с использованием компьютерных программ Statistica (версия 10.0) и Excel 2010. Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0,05$.

Установлено, что в листьях контрольных растений содержание фотосинтетических пигментов (Хл ($a + b$) и каротиноидов) в пересчете на сырую массу листа составляло 2,4 и 0,4 мг/г сырой массы соответственно. Отмечено некоторое снижение содержания Хл ($a + b$) в листьях при инокуляции корневой системы черенков винограда дрожжевыми грибами (не более 4 %). Штамм дрожжевого гриба № 27 демонстрировал хорошие показатели содержания Хл ($a + b$) на уровне контроля (или выше), но уменьшал количество каротиноидов на 24 %. Количество каротиноидов в листьях винограда, инокулированного дрожжевым грибом № 32 оставалось на уровне контроля. Достоверное уменьшение содержания каротиноидов до 34 % относительно контроля отмечалось при инокулировании корней винограда дрожжевым штаммом № 64.

Содержание МДА в листьях винограда контрольных растений составило 162 нмоль/г сырой массы. Достоверное его уменьшение на 24 % в сравнении с контролем отмечено при инокуляции корней дрожжевым грибом № 64, выделенным из эписферы ягод винограда на стадии сбора урожая. Дрожжевые грибы № 17 и № 27 увеличивали содержание МДА на 6,9 и 12,3 % соответственно. Повышение активности ПОЛ, по-видимому, свидетельствует о том, что в определенной степени имеются стрессовые условия, в результате чего может происходить дестабилизация клеточных мембран.

Показатели содержания фотосинтетических пигментов и уровень активности ПОЛ в листьях могут в дальнейшем быть использованы в качестве дополнительного инструмента для оценки эффективности ассоциативного взаимодействия между растениями винограда и изученными микроорганизмами.

Список использованных источников

1. Мерзляк, М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М.Н. Мерзляк // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – 1989. – Т. 6. – С. 111–123.

Динамика накопления полисахаридов молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus*

Гапонова И.И., Щетко В.А., Романова Л.В., Макаревич О.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

Экзополисахариды молочнокислых бактерий являются природными биополимерами, вязкость которых зависит от динамического состояния жидкости. В состоянии покоя они достаточно плотные, однако при встряхивании переходят в жидкую форму. Вязкость является важным показателем при использовании полисахаридов в различных сферах промышленности [1]. Количество полисахаридов и их реологические свойства зависят от таких факторов, как состав питательной среды, pH, температура, время культивирования и др.

Цель работы – изучение динамики накопления полисахаридов молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В 461 Г.

Количество полисахаридов и их реологические свойства (кинематическую вязкость) изучали в диапазоне температур культивирования штамма 25–42 °С на питательных средах различного состава [2]. Кинематическую вязкость исследовали при помощи капиллярного вискозиметра ВПЖ-4. Количество полисахаридов измеряли фенол-серноокислым методом на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 480 нм [3].

Максимальная продукция полисахаридов наблюдалась на средах с сухим молоком (1,1 мг/мл) и молочной сывороткой (1,0 мг/мл), значительно меньше на синтетических питательных средах (0,5–0,7 мг/мл).

Дальнейшее изучение динамики накопления полисахаридов и кинематической вязкости проводили на среде с сухим обезжиренным молоком. Наблюдалась корреляция накопления полисахаридов в диапазоне температур культивирования 25–42 °С. Показано, что максимальное количество полисахаридов и кинематической вязкости было в начале стационарной фазы роста бактерий, затем постепенно эти показатели снижались. Ввиду различной скорости роста бактерий при исследуемых температурах максимальная вязкость и количество полисахаридов наблюдались в разный момент времени (рис. 1).

Сравнительная характеристика кинематической вязкости показала, что при температуре 30 °С максимальная вязкость была 1,56 мм²/с, что соответствовало количеству полисахаридов 1,22 мг/мл. Самый низкий показатель был при 25 °С (кинематическая вязкость 1,016 мм²/с, полисахарид 0,8 мг/мл) и 42 °С (кинематическая вязкость 1,02 мм²/с, полисахарид 0,81 мг/мл). При температуре культивирования 37 °С кинематическая вязкость составляла 1,16 мм²/с, а полисахарид – 0,92 мг/мл (рис. 2).

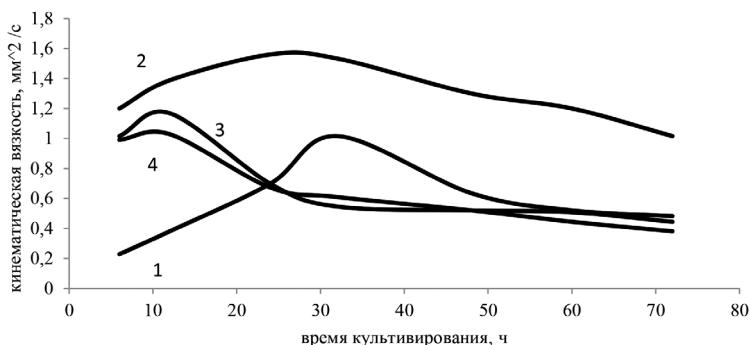


Рис. 1. Кинематическая вязкость полисахаридов молочнокислых бактерий *L. helveticus* БИМ В 461 Г. Температура культивирования: 1 – 25 °С; 2 – 30 °С; 3 – 37 °С; 4 – 42 °С

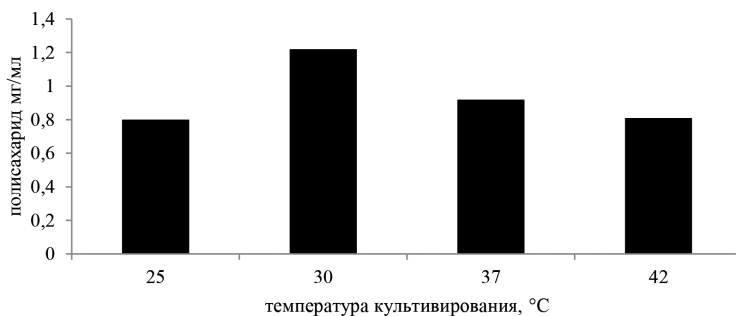


Рис. 2. Накопление полисахаридов молочнокислых бактерий *L. helveticus* БИМ В 461 Г при различных температурах культивирования

Таким образом, максимальное количество полисахаридов и наилучшие реологические свойства наблюдались на среде с сухим обезжиренным молоком при температуре культивирования 30 °С.

Список использованных источников

1. Фокина, Н.А. Выделение, характеристика экзополисахаридов молочнокислых бактерий и перспективы их применения : дис. ... канд. с.-х. наук : 1.5.6. / Н.А. Фокина. – Саратов, 2021. – 112 л.
2. Гапонова, И.И. Подбор питательной среды для культивирования и изучения динамики роста молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г / И.И. Гапонова, В.А. Щетко, Л.В Романова // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2021. – Т. 13. – С. 42–52
3. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois [et al.] // *Analyt. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.

Влияние внесения костры льна, обработанной микробным препаратом «Биопродуктин», на микробоценоз приствольных полос яблони в карликовом саду интенсивного типа

Гирилович Н.И.¹, Шмыга Е.Ю.¹, Мандрик-Литвинкович М.Н.¹, Шешко П.С.², Коломиец Э.И.¹

¹ГНПО «Хімічны сінтэз і біатэхналогіі», Мінск, Беларусь,

электронны адрас: gpro@biotech.bas-net.by

²УО «Гродзенскі дзяржаўны аграрны ўніверсітэт», Гродно, Беларусь

Яблоня – найбольш распаўсюджаная семечковая плодовая культура, якая дзякуючы высокай прадукцывасці і адаптыўнасці да канкрэтных умоваў прайзрасцання пераважае ў садах Беларусі. Апыт развіцця светавога плодаводства паказвае, што найбольш эфектыўным прамысловым тыпам сада яблоні з'яўляецца інтэнсіўны сад на карліковых падвоях. Такія сады адрозніваюцца высокай прадукцывасцю, звязанай з павялічанай шчыльнасцю дрэў на гектар, раннім вступленнем у плоданосенне, а таксама высокай таварнасцю атрымаемай прадукцыі [1]. Адрознай асаблівасцю карліковых дрэў з'яўляецца пераважна паверхнае размяшчэнне, што робіць іх уязлівымі да неспрыяльных умоваў асяроддзя (недастаток пажыўных элементаў, ваганні тэмпературна-вогнявога рэжыма, парушэнне ваднага рэжыма).

Адным з агротэхнічных прыёмаў, які ўлучае вадны і тэмпературны рэжым глебы, пераапрацоўвае эрозійныя працэсы, робіць угнетаючае дзеянне на сарную расліннасць, з'яўляецца мульчаванне, якое заключаецца ў укладцы абарончага шара на паверхні глебы [2]. Выкарыстанне мульчы сумесна з микробнымі прэпаратамі комплекснага дзеяння можа спрыяць развіццю карысных груп глебных мікраарганізмаў, якія іграюць ключавую ролю ў падтрыманні плодороддзя глебы [3]. Цэлю нашых даследаванняў было вывучэнне ўплыву мульчавання кострой льна, апрацаванай микробным прэпаратам «Біапрадукцін», на асноўныя экалагічна-трофічныя групы мікраарганізмаў у прыствольных палосах яблоневага сада інтэнсіўнага тыпу апытнага поля УО «Гродзенскі дзяржаўны аграрны ўніверсітэт».

У канцы вегетацыйнага сезону ўстаноўлена станоўчае ўплывае мульчавання кострой льна (10 т/га), апрацаванай микробным прэпаратам «Біапрадукцін» (3 л/га), на микробоценоз сада інтэнсіўнага тыпу, што выражаецца ў павялічэнні колькасці карыснай глебнай мікрафлары. Так, у апытных варыянтах адзначана павялічэнне лічбы олигонитрофилов у 1,9 разоў, целюлозоразрушаючых мікраарганізмаў – у 2, микроміцетов у – 1,8, аммоні-

фикаторов – в 2,5, фосфатмобилизаторов – в 3,3, потребляющих минеральный азот микроорганизмов – в 2,4 раза.

Таким образом, применение в приствольных кругах яблонь в саду интенсивного типа костры льна и биопрепарата «Биопродуктин» способствует активизации микробиологических процессов в почве.

Список использованных источников

1. Грушева, Т.П. Современные тенденции создания интенсивных садов яблони / Т.П. Грушева, В.А. Левшунов // Плодоводство : сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства. – Минск, 2019. – Т. 31. – С. 272–281.
2. Recent advances in mulching materials and methods for modifying soil environment / M.A. Kader [et al.] // Soil and Tillage Research. – 2017. – Vol. 168. – P. 155–166.
3. Роль микроорганизмов в экологических функциях почв / Т. Г. Добровольская [и др.] // Почвоведение. – 2015. – № 9. – С. 1087–1096.

Перспективные штаммы бактерий рода *Bacillus* с полифункциональными свойствами

Гырнец Е.Ю., Асатурова А.М.

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»,
Краснодар, Россия,
электронный адрес: alena_fox95@mail.ru

Разработка биотехнологических подходов получения экологически безопасных биопрепаратов нового поколения является одним из путей решения проблемы защиты сельскохозяйственных культур от вредных организмов. При этом стоит учесть, что чем выше степень экологической безопасности биопрепарата, тем более узким является спектр его действия. В экономическом отношении этот аспект часто становится недостатком, так как требует более разнообразного ассортимента биопрепаратов по сравнению с химическими пестицидами. Преодоление такой ситуации требует поиска природных биологических агентов (основы биопрепаратов), которые наряду с действием на одну мишень, например, фитофага, способны одновременно проявлять антагонистическое влияние на возбудителя болезни того же растения. Примером таких перспективных микроорганизмов могут выступать бактерии рода *Bacillus*, которые наряду с фунгицидным и инсектицидным действием способны стимулировать рост и развитие растений [1].

В связи с этим актуален поиск и изучение высокоэффективных штаммов бактерий с полифункциональными свойствами для разработки на их основе экологически безопасных биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур.

Исследования проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» с использованием материально-технической базы УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (<https://ckp-rf.ru/usu/671367>). Разведение насекомых осуществляли в лаборатории химической коммуникации и массового разведения насекомых в лаборатории государственной коллекции энтомоакарифагов и первичной оценки биологических средств защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР с использованием УНУ «Технологическая линия по массовому разведению насекомых-энтомофагов» (<https://ckp-rf.ru/catalog/usu/671922>).

В лабораторных условиях был поведен многоступенчатый скрининг перспективных штаммов бактерий из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов: микроорганизмы» по критериям инсектицидной и фунгицидной активности.

Оценку инсектицидной активности проводили по общепринятым методам тестирования энтомопатогенных микроорганизмов [2] в отношении лабораторных популяций большой восковой моли (*G. mellonella* L.), большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor* L.) и природной популяции яблонной плодовой жорки. В результате исследований выявлено 17 штаммов бактерий с высокой инсектицидной активностью в отношении большой восковой моли и большого мучного хрущака с инсектицидной активностью от 52,0 до 99,6 % к пятым суткам исследований. Выявлен наиболее эффективный штамм бактерий в отношении природной популяции яблонной плодовой жорки – BZR 1159 (71,4 % на пятые сутки), который проявил максимальную активность на гусеницах младших возрастов.

Для определения фунгицидной активности были отобраны перспективные штаммы бактерий с высокой инсектицидной активностью, которые тестировали в отношении фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Microdochium*, *Rhizoctonia*, *Venturia*, *Trichothecium*, *Cladosporium*, *Alternaria*. Выявлены штаммы с высокой антифунгальной активностью в отношении всех исследуемых тест-культур грибов: BZR 277 (43,6–67,0 %), BZR 920 (53,8–61,9 %), BZR 936 (42,1–60,4 %).

Таким образом, исследования показали потенциальную перспективность отобранных штаммов бактерий из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» в качестве биоагентов с полифункциональными свойствами.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № FGRN-2022-0005 и при поддержке гранта «УМНИК» Фонда содействия инновациям.

Список использованных источников

1. Ruiu, L. Microbial biopesticides in agroecosystems / L. Ruiu // Agronomy. – 2018. – Vol. 8, № 11. – P. 235.
2. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / под ред. В. В. Глупова. М. : Круглый год, 2001. – С. 352–427.

Оценка влияния микробных биопрепаратов на численность аммонифицирующих бактерий в посевах ячменя

Дайнеко Н.М., Концевая И.И., Тимофеев С.Ф.

*Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины,
Гомель, Беларусь, электронный адрес: dajneko@gsu.by*

В настоящее время изучение взаимодействия растений и микроорганизмов имеет особую актуальность, поскольку резкое сокращение минеральных и органических удобрений, средств защиты растений ставит необходимость поиска дополнительных источников азотного питания растений [1].

Исследования выполняли в весенний период 2021–2022 гг. на землях агрокомбината «Южный» Гомельского района Гомельской области.

Опыт был заложен на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве на посевах ячменя. Агрохимическая характеристика почвы опыта следующая: рН в КС1 – 5,9; фосфор – 281 мг/кг; калий – 262 мг/кг.

Варианты опыта:

- 1) контроль – без обработки посевов ячменя микробными биопрепаратами;
- 2) обработка посевов ячменя микробным биопрепаратом «Полибакт»;
- 3) обработка посевов ячменя микробным биопрепаратом «Гордебак»;
- 4) обработка посевов ячменя микробным биопрепаратом «Ресойлер».

Объектом исследований являлась биологическая активность эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов.

Микробиологическую индикацию почвы выполняли согласно общепринятым в почвенной микробиологии методам [2, 3].

Комплексный микробный препарат «Полибакт» и «Гордебак» разработаны в Институте микробиологии НАН Беларуси, «Ресойлер» – в РУП «Институт защиты растений».

Анализируя численность аммонифицирующих бактерий в зависимости от вариантов опыта и фаз развития ячменя по годам исследований видно, что в 2021 г. в фазе выхода в трубку наибольшая численность обнаружена в варианте «Гордебак», которое в 2,1 раза выше, чем в контроле; в 1,3 раза выше, чем в варианте «Ресойлер» и «Полибакт».

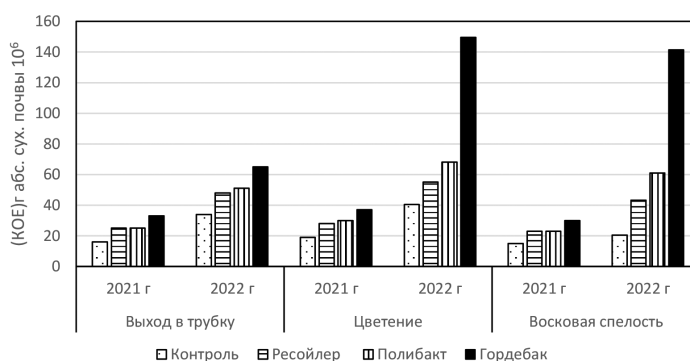
В 2022 г. средняя численность бактерий в этой же фазе развития имела схожее соотношение, как и в 2021 г. Более высокая численность отмечалась в варианте «Гордебак». Средняя численность в этой фазе в 2022 г. в 2 раза больше, чем в 2021 г.

В фазе цветения в 2021 г. также наибольшая численность микроорганизмов отмечена в варианте «Гордебак», которая превосходила численность в варианте контроль в 2 раза, в варианте «Ресойлер» – в 1,3 раза и в варианте «Полибакт» – в 1,2 раза. В 2022 г. в фазе цветения также наибольшая числен-

ность микроорганизмов отмечена в варианте «Гордебак», где она была выше в 3,8 раза, чем в контроле, в 2,7 раза – чем в варианте «Ресойлер» и в 2,3 раза – чем в варианте «Полибак».

В фазе восковой спелости численность бактерий имела такую же направленность, как и в фазе цветения. Так, в 2021 г. наибольшая численность наблюдалась в варианте «Гордебак», это в 2 раза выше, чем в контроле, в 1,3 раза чем в варианте «Ресойлер» и «Полибак».

В 2022 г. в фазе восковая спелость вариант с использованием «Гордебак» характеризовался высокой численностью бактерий по сравнению с другими вариантами. Так, она в 6,7 раза оказалась выше, чем в контроле, в 3,3 раза – в варианте «Ресойлер» и в 2,3 раза – в варианте «Полибак» (см. рисунок).



Сравнительный анализ численности аммонифицирующих бактерий в посевах ячменя в 2021 и 2022 гг.

Анализируя численность аммонифицирующих бактерий по каждому варианту опыта и фазам развития, можно отметить, что как в 2021 г., так и в 2022 г. наибольшая численность бактерий наблюдалась в фазе цветения, которая в среднем в 1,5 раза оказалась выше, чем в фазе выхода в трубку, и в 1,4 раза, чем в фазе восковой спелости. Среди изучаемых вариантов опыта наиболее высокая численность бактерий зафиксирована в варианте «Гордебак» в фазе выхода в трубку, в фазе цветения и в фазе восковой спелости.

Список использованных источников

1. Влияние биопрепаратов на численность основных физиологических групп микроорганизмов в почве и урожайность озимой пшеницы / А.С. Найденев [и др.] // *Фундаментальные исследования* [Электронный ресурс]. – 2008. – № 8. – С. 64–66. – Режим доступа: <http://mbio.bas-net.by/prod/polybact>. – Дата доступа: 27.03.2023.
2. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почв / под ред. Ю.М. Возняковской. – Л. : ВНИИСХМ, 1987. – 47 с.
3. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Агропромиздат, 1987. – 239 с.

Применение биофотоники для решения сельскохозяйственных задач

Дубасова Ю.А.^{1,2}, Максимов А.Ю.^{1,2}

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия,
электронный адрес: almaks1@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

Свет является одним из основных факторов формирования жизни на Земле и развития сложных форм жизни, главным источником энергии для биохимического синтеза. Биологическим его эффектам посвящена фотобиология – раздел науки, изучающий процессы фотосинтеза, биолюминисценции, влияния электромагнитного излучения на живые системы и их компоненты.

В настоящее время в связи с бурным развитием фотоэлектронной и лазерной техники, фундаментальных исследований оптических эффектов, спектральных, флуоресцентных и люминисцентных методов в отдельную сферу науки и техники выделена фотоника. Биофотоника – новая междисциплинарная область науки, находится на стыке фотоники и биологических наук, изучает эффекты взаимодействия биомолекул, биологических систем и живых организмов с различными видами электромагнитного излучения. Исследования в данной области связаны с развитием оптоволоконной и светодиодной техники, оптроники, методов молекулярной биологии и биохимии [1].

Фундаментальной частью биофотоники является классическая фотобиология, оптогенетика, а также разработка методологии молекулярно-биологических, цитологических, биохимических и биофизических исследований с применением когерентных источников света, оптических, флуоресцентных и люминисцентных методов, систем оптической детекции [1, 2].

На основе результатов фундаментальных работ активно развиваются фундаментально-прикладные и прикладные направления биофотоники:

разработка датчиков, узлов и приборов с применением лазеров, оптических детекторов, спектральных, флуоресцентных и люминисцентных методов, как основа современного биомедицинского и биотехнологического приборостроения (системы ПЦР-амплификации в реальном времени, цифровой ПЦР, автоматического биохимического анализа, капиллярного секвенирования ДНК и секвенирования нового поколения, NGS, микрочиповых гибридизационных и иммунофлуоресцентных исследований, проточной цитофлуорометрии и цитофотометрии, множественного иммуноанализа и др.) [1, 3], часть из которых в настоящее время пока не производятся в РФ и РБ;

разработка методов молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических и цитологических исследований, систем молекулярной диагности-

ки и биосенсоров, способов визуализации биологических структур и систем как основа для развития фундаментальной науки, медицинской и ветеринарной диагностики, аналитических и экологических исследований [2, 3];

агробиофотоника в сфере разработки методов и аппаратуры освещения при выращивании растений (тепличные хозяйства, гидропоника, аэропоника), способов управления развитием и продуктивностью растений, разработки датчиков, смежных технологий и препаратов, включая микробиологические и биохимические, для использования в светокультуре [4];

агробиофотоника в сфере применения когерентных УФ и ИК-источников для селекции микроорганизмов-продуцентов и сельскохозяйственных растений, а также для технологии клеточных культур. Применение когерентных источников для стимуляции прорастания, морфогенеза и роста сельскохозяйственных растений [4];

биофотоника в биокатализе, биофотокаталитические технологии для химического синтеза, фармакологии и биодеградации поллютантов.

Важной прикладной областью биофотоники является её применение в терапии заболеваний животных и человека, в том числе лазерные способы лечения дерматологических и полостных заболеваний, а также устранения дефектов; лазерная хирургия; фотодинамическая и фототермическая терапия различных заболеваний, в том числе онкологических и сосудистых; новые методы микроскопии и микроманипуляции с применением.

Развитие данных направлений в Союзном государстве позволит вывести методологию светокультуры, молекулярно-биологических исследований для сельского хозяйства и биологическое приборостроение на новый технологический уровень. Данные направления активно развиваются на базе Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН) и Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ) в сотрудничестве с ПНППК.

Работа проводится при финансовой поддержке государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122 031 100 058-3.

Список использованных источников

1. Popp, J. T Handbook of Biophotonics / J. Popp, V. Tuchin, A. Chiou ; ed. S.H. Heinemann. – Vol. 1: Basics and Techniques, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2011. – 686 p.
2. Оптогенетика растений – светорегуляция генетического и эпигенетического механизмов управления онтогенезом / Ю.Н. Кульчин [и др.] // Вестн. ДВО РАН. – 2020. – № 1. – С. 5–25.
3. Microfluidic impedance-based flow cytometry / K.C. Cheung [et al.] // Cytometry. Part A. – 2010. – Vol. 77 (7). – P. 648–666.
4. Кульчин, Ю.Н. Агробиофотоника – влияние света на развитие растений / Ю.Н. Кульчин // Фотон-Экспресс. – 2019. – № 6 (158). – С. 64.

Подходы к изучению механизмов защитного действия белка-индуктора из *Pseudomonas fluorescens*

Ерохин Д.В.¹, Эммер Д.Я.¹, Синельников И.Г.², Поплетаева С.Б.¹, Джавахия В.Г.¹

¹Всероссийский НИИ фитопатологии РАН, Большие Вяземы, Московская обл., Россия, электронный адрес: erokhin.denis.v@gmail.com

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Снижение содержания ксенобиотиков в агроценозах может достигаться благодаря применению в качестве альтернативного средства защиты биогенных индукторов системной устойчивости (СУ) растений. Одним из таких биогенных индукторов является белок MF3 [1], выделенный из ростстимулирующей бактерии *Pseudomonas fluorescens*. Структура MF3 и кодирующего этот белок гена были определены [2] и защищены патентами. Несмотря на то, что защитный эффект MF3 против основных типов фитопатогенов подтвержден на многих культурах результатами вегетационных опытов и полевых испытаний, механизм его действия на молекулярном уровне остается неизученным.

Мы предприняли попытку исследовать влияние MF3 на экспрессию маркерных генов табака, ассоциированных с его СУ к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Кроме того, мы попытались оценить влияние изменения структуры активного центра (АЦ) MF3 на его защитный эффект, используя метод аланинового сканирования [3], а также исследовали защитный эффект против ВТМ при совместном применении MF3 и другого микробного белка-индуктора MF2, выделенного из *Bacillus thuringiensis*.

В ходе опытов по изучению влияния MF3 на уровень экспрессии генов табака, ассоциированных с СУ, было обнаружено, что обработка растений MF3 приводит к усилению экспрессии ряда маркерных генов, ассоциированных с системной приобретённой устойчивостью (SAR).

С помощью аланинового сканирования получены мутанты с последовательной заменой на аланин аминокислот в составе АЦ MF3. Бiotесты с обработкой ими растений табака показали, что некоторые из этих мутантных белков имеют различную защитную активность.

Эксперименты по сравнению защитной активности смеси MF2 и MF3 с активностью каждого из этих белков показали, что обработка листьев табака их смесью более эффективно снижает число некрозов на зараженных ВТМ листьях, чем индивидуальные белки в вдвое более высокой концентрации – (см. таблицу). Эти данные позволяют предположить, что исследуемые белки

воздействуют на разные мишени в тканях растения и, возможно, индуцируют разные защитные ответы. Таким образом, механизмы действия исследуемых белков могут различаться, а их совместное действие может иметь синергетический характер.

Влияние обработок листьев табака сорта Ксанти белками MF2, MF3 или их смесью на развитие симптомов поражения ВТМ при нанесении белков и смеси на разные половинки каждого листа

Вариант обработки*	Число некрозов					в среднем на лист (M ± m)	P _{95%}
	на каждом из 5 инокулированных листьев						
MF3 на правой половинке	133	154	65	183	152	137 ± 19,7	0,02
MF3+MF2 на левой половинке	85	88	19	79	73	69 ± 2,2	
MF2 на правой половинке	19	19	13	25	14	18 ± 2,1	0,004
MF2+MF3 на левой половинке	6	3	5	4	6	5 ± 0,6	
H ₂ O на правой половинке	207	134	239	200	149	166 ± 19,4	0,4
H ₂ O на левой половинке	189	129	197	104	186	161 ± 18,7	

*Концентрация MF3 и MF2 при применении по отдельности – 0,001 и 0,5 мг/мл соответственно; конечные концентрации MF3 и MF2 в смеси – 0,0005 и 0,25 мг/мл соответственно. Конечные концентрации общего белка при индивидуальной и комбинированной обработке одинаковы.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00154).

Список использованных источников

1. MF3 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) – an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens / D. Shumilina [et al.] // *Phytopathologia Polonica*. – 2006. – Vol. 41, № 1. – P. 39–49.
2. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests: pat. PCT WO2005/061533 A1 / V. Dzhevakhya [et al.]. – Publ. date: 07.07.2005.
3. Morrison, K.L. Combinatorial alanine-scanning / K.L. Morrison, G.A. Weiss // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2001. – Vol. 5, № 3. – P. 302.

Влияние электропроводящих материалов и диэлектрических аналогов на процесс анаэробного сбраживания сточной воды свинофермы в непрерывных условиях

Журавлева Е.А.¹, Шехурдина С.В.^{1,2}, Лайкова А.А.^{1,2}, Литти Ю.В.¹

¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия, электронный адрес: zhuravleva_2595@mail.ru

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Животноводство является одной из ключевых отраслей сельского хозяйства, обеспечивающей человечество едой. Однако животноводство связано с формированием большого количества органических отходов, в частности сточных вод, а также навоза, которые требуют надлежащей обработки и утилизации [1]. Согласно данным Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, за 2021 год образовалось 46,9 млн т отходов, из которых 97,6 % приходится на навоз и его отдельные разновидности, в том числе помет, подстилка и прочее (образовано 45,7 млн т отходов). Анаэробное сбраживание (АД) является оптимальной технологией для переработки органических отходов, с полезными конечными продуктами в виде биогаза и биоудобрений. Несмотря на очевидные преимущества АД, целесообразность использования анаэробных реакторов по-прежнему вызывает серьезную озабоченность из-за нестабильности процесса, часто приводящей к сбоям [2]. Внесение разных материалов-носителей в реактор способствует биопленкообразованию, а использование электропроводящих и некоторых инертных материалов стимулирует прямой межвидовой перенос электронов (DIET), улучшающий стабильность и эффективность метаногенеза [3].

Целью данной работы было определение оптимального материала-носителя для метаногенного реактора типа биофильтр при анаэробном сбраживании сточной воды свинофермы с постепенным повышением нагрузки по органическому веществу со средней 4,74 г ХПК/л/сут до высокой 18,97 г ХПК/л/сут.

В качестве материалов-носителей использовались электропроводящие карбоновый войлок (R2) и нержавеющая сталь (R4) и диэлектрические аналоги: полиэфирный войлок (R3) и стекловолокно (R5), а также контрольный реактор без носителя (R1). Средняя скорость образования метана в R2 более чем на 42 % превышала скорость образования метана в контрольном реакторе, и на 87 % в сравнении с R3 при нагрузке 14,23 г ХПК/л/сут. Средний выход метана для R2 при нагрузке 18,97 г ХПК/л/сут был больше на 45 %, чем в контрольном реакторе. Наиболее высокое содержание метана было отмечено R2

и R5, а самое низкое – в R3 на протяжении всего эксперимента. Сканирующая электронная микроскопия выявила наличие пилеподобных структур, вероятно участвующих в DIET на биопленках в R2. Анализ микробного сообщества биопленок реакторов выявил доминирование гидрогенотрофных представителей рода *Methanothermobacter* во всех образцах. Основными бактериальными представителями были синтрофные рода *Syntrophaceticus*, *Syntrophomonas*, *Pelotomaculum* и группы *Limnochordia MBA03*, *Clostridium sensu stricto 1*.

На основании биотехнологических и микробиологических параметров оптимальным носителем является карбоновый войлок (R2), существенно улучшающий параметры анаэробного сбраживания путем активизации прямого межвидового переноса электронов и обладающий развитой площадью поверхности для лучшего биопленкообразования. Полученные экспериментальные данные позволяют масштабировать технологию анаэробной переработки стоков животноводства, увеличить скорость разложения органического вещества с повышенной скоростью образования метана

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список использованных источников

1. Effects of various materials used to promote the direct interspecies electron transfer on anaerobic digestion of low-concentration swine manure / E.A. Zhuravleva [et al.] // Sci. Total Environ. – 2022. – Vol. 839. – P. 156 073.
2. Application of machine learning in anaerobic digestion: Perspectives and challenges / I.A. Cruz [et al.] // Bioresour. Technol. – 2022. – Vol. 345. – P. 7. 126 433.
3. Mesophilic anaerobic co-digestion of acorn slag waste with dairy manure in a batch digester: focusing on mixing ratios and bio-based carbon accelerants / Z. Wang, [et al.] // Bioresour. Technol. – 2019. – Vol. 286. – P. 121 394.

Эффективность биогенных наночастиц серебра против некоторых грибов, поражающих растения

Зайнитдинова Л.И.¹, Лазутин Н.А.¹, Жураева Р.Н.¹, Мавжудова А.М.¹,
Эргашев Р.Б.¹, Хегай Т.Б.¹, Рахманова В.Н.²

¹Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: zajn-lyudmila@yandex.ru

²Институт химии и физики полимеров АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Сельскохозяйственный сектор сталкивается со многими глобальными проблемами, одной из которых является нарушение экологии, в том числе в результате широкого и не всегда контролируемого использования пестицидов и удобрений, которые будут усугубляться в условиях роста населения и нехватки продовольствия. Следовательно, необходимость изменения традиционных методов ведения сельского хозяйства и замены их новыми технологиями имеет важное значение, и применение нанотехнологий, особенно «зеленых» технологий, открывает значительные перспективы в решении этих проблем. Нанотехнологии обладают большим потенциалом для преобразования различных областей сельскохозяйственного сектора. Производство наночастиц физическими и химическими методами требует использования опасных материалов, современного оборудования и оказывает негативное воздействие на окружающую среду. Тогда как биологический метод с использованием широкого спектра микроорганизмов обеспечивает надежные и устойчивые методы биосинтеза наночастиц [1]. Поэтому эта область быстро развивается, и постоянно пополняется новыми методами для улучшения свойств наночастиц.

Установлено, что, нанотехнологии могут оказать положительное влияние на улучшение качества сельскохозяйственной продукции, сведение к минимуму неблагоприятного воздействия сельскохозяйственных пестицидов на окружающую среду и здоровье человека, а также повышение производительности и продовольственной безопасности [2, 3].

В работе использовались наночастицы серебра, полученные биологическим путем с помощью микроскопических грибов *Trichoderma harzianum*, добавлением ионов серебра в концентрации 100 мг/л. Было определено влияние полученных наночастиц (НЧ), а также композитов наночастиц с сульфатом хитозана (СХЗ) в концентрации 0,001 % на рост фитопатогенных грибов. В результате исследований показано, что синтезированные микромицетами наночастицы серебра проявили антифунгальную активность в отношении грибов *Fusarium moniliforme* и *Verticillium dahliae*, использование нанокompозита оказало большую эффективность в случае гриба *F. moniliforme*. Также надо отметить, что используемый для синтеза наночастиц штамм гриба

T. harzianum-24 проявил антагонизм в отношении грибов *F. solani*, *F. vasinfectum* и *Alternaria* sp., тогда как подавления роста данных грибов синтезированными им наночастицами не выявлено (см. таблицу).

Зоны подавления роста фитопатогенных грибов наночастицами серебра и нанокompозитами

Тест-культура	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	КЖ <i>T.harzianum</i> -24	КЖ <i>T.harzianum</i> -24 + НЧ серебра	КЖ <i>T.harzianum</i> -24 + НЧ серебра + СХЗ	Раствор нитрата серебра
<i>F. oxysporum</i>	–	–	–	–
<i>F. solani</i>	23*	–	–	–
<i>F. moniliforme</i>	–	22	24	–
<i>F. vasinfectum</i>	17*	–	–	–
<i>V. dahlia</i>	–	16	–	–
<i>Alternaria</i> sp.	23*	–	–	–

*Наблюдается рост гриба-антагониста.

Таким образом, выявлена эффективность биогенных наночастиц серебра против некоторых грибов, поражающих растения. Проведенные исследования дают ценную предварительную информацию о биогенных наночастицах и композитах на основе наночастиц серебра для использования их в борьбе с различными патогенами.

Список использованных источников

1. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms / P. Singh [et al.] // *Bio-technology Trends*. – 2016. – Vol. 34 (7). – P. 588–599.
2. Nanotechnologies in agriculture: what innovative potential do they have? / L.F. Fraceto [et al.] // *Environmental science front*. – 2016. – Vol. 4. – P. 20.
3. Green nanomaterials contributing to agri-food sustainability / S. Bartolucci [et al.] // *Trends in Anal Chemistry*. – 2020. – Vol. 125. – P. 115 840.

Ассоциация агрономически ценных микроорганизмов для улучшения плодородия земель

Заяц В.С., Зыль Н.С., Налетов И.В., Пятакова Т.И.

ЗАО «Струнные технологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: v.zayats@unitsky.com

Микроэлементный состав современных сельскохозяйственных почв за сотни лет их интенсивной эксплуатации значительно ухудшился. При выращивании различных культур из почвы ежегодно выносятся урожаем широкий спектр питательных элементов, а обратно в виде растворимых минеральных удобрений поступают не все. В результате происходит снижение плодородия почв, обеднение её минералогического состава и снижение качества растительной продукции. Почвенные микроорганизмы синтезируют питательные вещества и переводят минералы в доступную для растений форму, вырабатывают гормоны, стимулирующие рост, поддерживают иммунную систему растений и запускают или ослабляют реакцию на стресс [1]. Основным интересом для сельского хозяйства представляют бактерии, обитающие в ризосферном слое почвы. В ней существует большое количество симбиотических микроорганизмов – стимулирующие рост растений ризобактерии (plant growth-promoting rhizobacteria, или PGPRs) [2]. Микробные представители этой группы усиливают рост и развитие растений посредством синтеза различных агроактивных веществ, таких как сидерофоры, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминаза, фитогормоны, например, индолилуксусная кислота, гибберелловая кислота, летучие органические соединения, антибиотики, цианиды и ферменты, разрушающие клеточные стенки грибов [3].

Для создания универсальной подкормки для сельскохозяйственных растений целесообразно использовать азотфиксирующие бактерии (симбиотические и свободноживущие), фосфатсольбилизирующие, фосфатмобилизирующие, PGRs, увеличивающие биодоступность калия, цинксольбилизирующие, окислители серы, кремнийсольбилизирующие.

Подобрана ассоциация почвенных микроорганизмов на основе бактерий из различных родов (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*). Данная ассоциация была также использована для создания рассыпчатой подкормки [4]. Для тестирования влияния подобранных штаммов агрономически ценных микроорганизмов на рост и развитие растений был поставлен эксперимент с растениями салата латук (*Lactuca sativa* L.). Исследования проводили в ёмкостях с торфяным почвенным субстратом. Концентрация почвенных микроорганизмов в инокуляте при внесении составляла $1 \cdot 10^{10}$ /г, применялась периодическая обработка в соотношении от 1:20 до 1:200 (см. рисунок). Проводилась корневая подкормка.



Влияние почвенной ассоциации микроорганизмов на рост и развитие салата латук (*Lactuca sativa* L.)

В ходе эксперимента проводились замеры роста растений каждые 3 дня, в конце фиксировали общую биомассу вегетативной части растений и количество нитратов. В сравнении с контролем применение подобранной ассоциации увеличивало конечную биомассу на 27 %. Количество нитратов во всех образцах не превышало ПДК.

На основе этих и других проведенных исследований была создана подкормка почвенный эликсир «иТегга», которая помимо ассоциации микроорганизмов содержит экстракт гуминовых кислот и может применяться как универсальная подкормка для сельскохозяйственных культур.

Список использованных источников

1. Etesami, H. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects / H. Etesami, D.K Maheshwari // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2018. – Vol. 156. – P. 225–246.
2. Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) / G. Santoyo [et al.] // *Biology*. – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 475.
3. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms / M. Maćik [et al.] // *Advances in agronomy*. – 2020. – Vol. 162. – P. 31–87.
4. Разработать подкормку на основе ассоциации агрономически ценных микроорганизмов и органического сырья и провести исследование ее эффективности на зеленых и овощных культурах [Электронный ресурс] : отчет о НИР (заключ.) / ЗАО «Струнные технологии»; рук. С.В. Артюшевский. – Минск, 2022. – 53 с

Видовое разнообразие грибов в корнях адаптантов *Vaccinium corymbosum* L.

Зимич С.П.¹, Яковлев А.П.¹, Булавко Г.И.¹, Баранов О.Ю.²,
Ботяновская Ю.И.³, Костюков А.А.³

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: antohina_lana@mail.ru

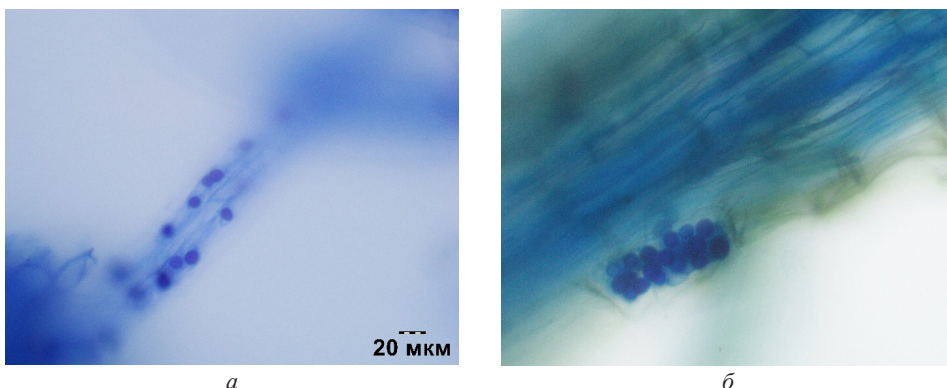
²Национальная академия наук Беларуси,

³КФХ «Ягодка»

Использование микроклонального размножения с целью тиражирования посадочного материала сортовой голубики отличается высокой степенью эффективности. В ряде стран на стадии адаптации микросаженцев используют обработку симбиотическими бактериями и (или) грибами [1]. Микробный препарат «МаКлоР», разработанный Институтом микробиологии НАН Беларуси, на стадии адаптации микроклональных саженцев рода *Vaccinium* показал свое стимулирующее действие [2]. Но исследований по идентификации видоспецифичности грибной компоненты в корневой системе опытных растений не проводилось. Кроме того, высокий уровень влажности торфяного субстрата и умеренный температурный режим при культивировании адаптантов вызывает на его поверхности развитие плесневых грибов, подавляющих ростовую функцию опытных растений. Для изучения этих вопросов был заложен опыт с использованием двух микробных препаратов, включающий 3 варианта: контроль (без обработки), обработка адаптантов раствором «МаКлоР» с грибами-микоризообразователями (концентрация 50 %), совместная обработка «МаКлоР» с грибами-микоризообразователями (концентрация 50 %) и «Фунгилексом» (концентрация 1 %). Последующие обработки проводили путем полива на стадии адаптации *ex vitro* через 1, 5, 4 и 6 месяцев после пересадки с одновременным отбором образцов для аналитических работ.

Определение видового разнообразия грибов-микоризообразователей у адаптантов голубики высокорослой осуществляли метагенетическим анализом, проводимым в три этапа: получение препаратов суммарной ДНК с использованием модифицированного СТАВ-протокола [3], проведение ПЦР-амплификации маркерного локуса ITS1, высокопроизводительное секвенирование.

При микроскопировании образцов в клетках корней адаптантов голубики высокорослой наблюдались не только структуры грибов-микоризообразователей, но и микросклероции темных септированных эндофитов (см. рисунок). Для корневой системы голубики контрольного варианта данные структуры были отмечены только на 4-й месяц после закладки опыта, в то время как в вариантах с обработкой препаратами и микориза, и микросклероции наблюдались уже через 1,5 месяца.



а *б*
Микроскопирование корневой системы адаптантов голубики высокорослой
в варианте с обработкой микробным препаратом «МаКлоР»:
а – через 1,5 месяца после обработки; *б* – через 4 месяца после обработки

Метагенетический анализ грибов в корнях адаптантов голубики высокорослой представлен в общедоступной базе данных GenBank NCBI (коды доступа – PRJNA892 092, PRJNA885 749). По его результатам высокая степень видового разнообразия грибов в клетках корней адаптантов на начальной стадии наблюдалась в варианте с использованием микробного удобрения «МаКлоР». Через 3 месяца после закладки опыта различия практически нивелировались.

Используя информацию базы данных GenBank NCBI были определены следующие представители грибов: *Trichoderma viride* (встречалась в варианте с использованием двух микробных препаратов), *Magnaporthaceae* sp., *Sebacinales* sp., представители порядка *Helotiales*. Выполненные исследования позволили установить качественный и количественный состав грибов, инфицирующих корни голубики на этапе адаптации.

Список использованных источников

1. Яблонская, М.И. Биотизация растений *in vitro* / М.И. Яблонская, М.С. Гинс, М.А. Молчанова // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Агронимия и животноводство. – 2016. – № 1. – С. 15–20.
2. Подбор композиционного состава микробного препарата для укоренения микроклональных растений древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* : сб. докл. Междунар. конгр. «Биотехнология – состояние и перспективы развития», март 2013 г. / Л.Е. Картыжова [и др.]. – М., 2013. – С. 13–14.
3. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск : Юнипол, 2007. – 176 с.

Ферменты с повышенной термостабильностью для использования в кормовой и пищевой промышленности

Зоров И.Н.^{1,2}, Рожкова А.М.^{1,2}, Доценко А.С.¹, Короткова О.Г.¹,
Денисенко Ю.А.¹, Сеницын А.П.^{1,2}

¹ *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, Россия*

² *Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
электронный адрес: inzorov@mail.ru*

В современном мире развитие животноводства и птицеводства неразделимо связано с внедрением методов интенсивного производства продукции с использованием последних достижений биотехнологии. Затраты на корма составляют около 2/3 всех затрат при производстве продукции птицеводства и животноводства, поэтому оптимизация состава кормов, повышение степени конверсии корма в организме животных позволяет сократить себестоимость при одновременном увеличении объема и качества готовой продукции.

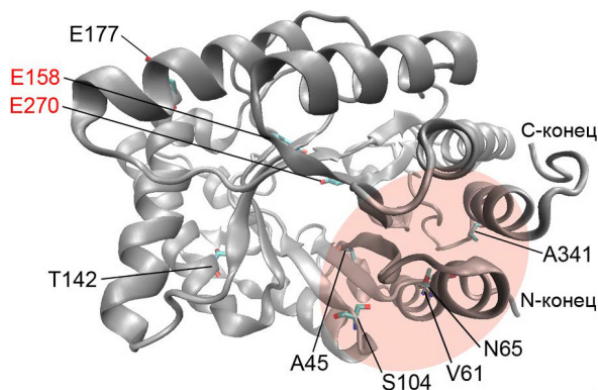
Основными компонентами комбикормов «европейской» диеты является зерно злаковых как источник углеводов зернобобовые и шроты – источники белка и жиров.

Как известно, зерно, являющееся основой любых комбикормов, содержит набор некрахмальных полисахаридов (НПС), которые являются антипитательным фактором и затрудняют процесс переваривания комбикорма. Основными НПС злаков являются β -глюкан и ксилан. Именно вязкие растворы β -глюканов и арабино-ксиланов, не гидролизующихся в желудочно-кишечном тракте, являются источником проблем при скармливании ячменя и ржи, и, отчасти, пшеницы (в зависимости от ее вязкости). Поэтому одной из основных составляющих производства современных комбикормов является использование в рецептурах ферментных препаратов целлюлаз (преимущественно, β -глюканаз) и ксиланаз для коррекции антипитательных факторов и улучшения усвояемости компонентов кормов.

В состав зернобобовых и шротов входят такие антипитательные компоненты, как галактоолигосахариды – стахиоза и раффиноза, которые расщепляются под действием α -галактозидаз и инвертаз. Фосфаты, содержащиеся в растительном сырье в виде фитатов, высвобождаются под действием фитаз.

Другой, не менее важной, проблемой кормопроизводства является сохранение активности ферментных препаратов при прохождении процедуры грануляции корма при температурах до 90 °С, поэтому разработка кормовых ферментных препаратов с повышенной термостабильностью является актуальной задачей.

Применение методологии предсказания аминокислотных замен позволило методами белковой инженерии получить набор целевых ферментов с повышенной термостабильностью и сохранением уровня каталитической активности (см. рисунок). Так, замена S104M в ксиланазе E из *Penicillium canescens* позволило увеличить T_m (точка плавления белка) на 3,1 °С, а температура полуинактивации фермента выросла при этом в 1,7 раза при 70 °С, а в многоточечном мутанте эндоглюканазы (ЭГ-МЕ4) T_m гомогенного фермента было повышено на 6,6 °С.



Трёхмерная структура XylE *P. canescens* (PDB ID 4F8X).
Каталитически активные а/к остатки E158 и E270 выделены красным цветом.
Регион N- и C-концов показан розовым цветом

На основе высокопродуктивной экспрессионной системы грибов рода *Penicillium* были получены новые ферментные препараты с улучшенной операционной стабильностью. Показано, что термостабильность ферментных препаратов повышена в случае ксиланазы и эндоглюканазы в 2 раза при 90 °С, в случае фитазы – в 6 раз.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в соответствии с договором № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета РФ. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития НЦМУ «Агротехнологии будущего».

Список использованных источников

1. Enhancement of thermostability of GH10 xylanase E *Penicillium canescens* directed by $\Delta\Delta G$ calculations and structure analysis / A.S. Dotsenko [et al.] // Enzyme Microb. Technol. – 2021. – Vol. 152. – P. 109-938. doi: org/10.1016/j.enzmictec.2021.109938
2. Enhancement of activity and thermostability of *Aspergillus niger* ATCC 10864 phytase A through rational design / A.S. Dotsenko [et al.] // BBRC. – 2022. – Vol. 634. – P. 55–61. doi: org/10.1016/j.bbrc.2022.10.010

Разработка оптических и ультразвуковых методов исследования многофазных течений для верификации численных расчетов крупнотоннажных биореакторов

Кабардин И.К., Меледин В.Г., Лобанов П.Д., Двойнишников С.В.

*ФГБУН «Институт теплофизики им. С.С. Кутателадзе СО РАН»,
Новосибирск, Россия,
электронный адрес: ivankabardin@gmail.com*

Важнейшим прикладным аспектом микробных технологий является создание крупномасштабных биореакторов для получения продукта, например, путем ферментации бактериями определенных газов. Это актуально как для биотехнологий в сельском хозяйстве, так и в биотехнологиях для медицины и промышленности. Современные научно-инженерные подходы к конструированию биореакторов опираются на газо-гидродинамическое моделирование как инструмент тестирования конструкционных гипотез. Однако для того, чтобы иметь адекватный предсказательный уровень полученной модели, математическое моделирование нуждается в точных исходных данных и экспериментальной валидации расчетов. Измерение газо-гидродинамических характеристик биореакторов является сложной задачей вследствие высокой оптической плотности среды и высоких скоростей течения, что накладывает физические ограничения на применяемое измерительное оборудование. Из-за сложности и редкой востребованности данного оборудования не существует коммерчески доступных решений под конкретные ферментационные процессы. Поэтому разработка измерительного оборудования для диагностики многофазного газожидкостного потока в гидродинамической модели реактора ферментации с оптически плотными средами носит эксклюзивный характер. Для снижения удельных энергозатрат на ферментацию требуется поиск методов достижения высокоэффективного массообмена при малых скоростях движения несущей жидкой фазы (т. е. малых энергозатратах).

Цель работы – разработка методов лазерной доплеровской анемометрии, волоконно-оптического метода диагностики газовых фракций и ультразвуковых методов, а также зондовых эндоскопических методов исследования течения многофазной среды в промышленных микробных технологиях.

В настоящее время существует целый ряд методов для диагностики размера пузырей и газосодержания. Все они обладают своими достоинствами и недостатками. Применение оптических методов, которые исследуют среду через иллюминатор, затруднено в связи со слабой прозрачностью культуральной среды. Существует класс методов на основе зондовых оптоволоконных методов и метод диагностики локального газосодержания, которые можно ис-

пользовать в зондовом исполнении. Диагностические системы на основе таких подходов позволяют измерить локальные распределения размеров пузырей, газосодержания и теплофизических параметров. Примеры применения таких методов встречаются в виде научных статей с применением методов в лабораторных исследованиях. В промышленных технологиях такого рода методы не применялись. Поэтому использование зондов с такого рода методами позволят впервые получить новую информацию о размерах пузырей и о локальном газосодержании в малопрозрачной культуральной жидкости, в которой проходит активный биологический процесс.

Первый метод – метод лазерной доплеровской анемометрии, позволяющий измерять поля скоростей в двухфазных потоках. Метод измеряет частоту доплеровского сдвига от трассирующих частиц, проходящих через измеряемый объем. Возможности метода позволяют измерять три составляющие вектора скорости с погрешностью не более 0,5 %. Второй метод представляет собой оптоволоконный метод локального измерения газовой фракции. Метод позволяет регистрировать свет, отраженный от газовой среды через оптическое волокно. Третий метод основан на ультразвуковом измерении доплеровского сдвига от неоднородностей в двухфазном потоке. Погрешность двух последних методов не превышает 10 %. Выполнение экспериментальных исследований локальной гидродинамики, тепло- и массообмена, взаимодействия газовой и жидкой фаз дисперсных потоков применительно к течениям в элементах энергетических реакторов. Наполнение базы данных по локальным параметрам течения, таких как эволюция дисперсной фазы в жидкости, распределения скорости фаз, трения на стенке, газосодержания, коэффициентов тепло- и массообмена на температуры, давления. Численное и аналитическое исследование влияния дисперсной фазы на двухфазное течение в зависимости от скорости течения, газосодержания, теплофизических свойств жидкости и химического состава газовой фазы, использование предельных асимптотических моделей для их внедрения в численные коды и для их верификации.

Приведены результаты применения методов измерения кинематических параметров потока и газосодержания в различных технологических приложениях. Показаны как возможности удаленного применения методов, так и реализация в пробном варианте. Результаты применения методов позволили получить новые фундаментальные механизмы и создать новые экспериментальные базы данных для проверки численных расчетов.

Работа выполнена в рамках государственного контракта с ИТ СО РАН (121 032 200 034-4 и 123 012 700 035-6).

Список использованных источников

1. Меледин, В.Г. Информационная оптоэлектрическая диагностика: наука и промышленные технологии / В.Г. Меледин. – Новосибирск : Академиздат, 2015. – 142 с.

Повышение устойчивости растений картофеля к Y-вирусу при применении *Bacillus subtilis* 47 в смеси с метилжасмонатом

Калацкая Ж.Н.¹, Балюк Н.В.¹, Ламан Н.А.¹, Герасимович К.М.¹,
Рыбинская Е.И.¹, Яруллина Л.Г.², Цветков В.О.³

¹Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kalatskayaj@mail.ru

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

³Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

Картофель служит ценным источником питательных веществ (крахмала, белков, витаминов, органических кислот, антиоксидантов и др.). По валовому производству картофеля Беларусь занимает 8-е место среди самых крупных производителей этой культуры в мире. Согласно прогнозам ФАО мировое производство картофеля ежегодно будет увеличиваться на 2,5 %. В результате рыночный спрос на эту культуру и продукты ее переработки в перспективе будет расти [1]. Вирусные болезни картофеля являются одной из основных причин ухудшения семенных качеств клубней и снижения продуктивности растений. Наиболее опасными вирусами в настоящее время считаются PLRV (*Potato leafroll virus*) и PVY (*Potato virus Y*). Они распространены повсеместно и способны вызывать до 80 % потери урожая картофеля в зависимости от региона, сорта и различных факторов окружающей среды [2, 3].

В настоящее время первостепенной задачей растениеводства является использование эффективных и безопасных для окружающей среды и человека средств защиты растений. Во всем мире данное направление все более успешно конкурирует с химическими средствами защиты растений [4–6]. Считается, что биопрепараты вызывают активацию тех физиолого-биохимических процессов, которые участвуют в формировании неспецифического ответа растений на внешнее стрессовое воздействие. Так, обработка растений препаратами непатогенных ризобактерий повышает чувствительность генов, вовлеченных в системную приобретенную устойчивость или системную индуцированную устойчивость, при последующем инфицировании патогенами [6–8]. К недостаткам биопестицидов можно отнести более низкую скорость уничтожения патогенов по сравнению с химическими пестицидами и высокую чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды. Защитный спектр биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* можно значительно расширить, комбинируя их применение с сигнальными молекулами растительной клетки [9–10]. Недавно показано, что кроме индукции защитных путей у растений экзогенное применение жасмоновой кислоты увеличивает альфа-разнообразие

ризосферы арабидопсиса, наряду с обогащением несколькими потенциально полезными микробными таксонами. Однако сообщалось и о противоположном влиянии жасмоновой кислоты на состав микробных сообществ листьев арабидопсиса и эндосферы корней пшеницы [11].

В нашем исследовании выявлено повышение биологической активности состава на основе бактерий *Bacillus subtilis* штамм 47 при включении метилжасмоната, существенно снижающего заражение Y-вирусом листьев и стимулирующего рост побегов по сравнению с инфицированными растениями, что позволило увеличить продуктивность картофеля – массу получаемых мини-клубней, а также содержание в них сухого вещества и крахмала. Обработка *Bacillus* с МеЖ способствовала уменьшению стресс-индуцируемого накопления в листьях инфицированных растений пролина, фенольных соединений, растворимых углеводов и активности основных антиоксидантных ферментов. Отмечено изменение соотношения синтезируемых фенольных веществ.

Список использованных источников

1. Петрович, Э.А. Белорусский рынок картофеля: состояние и перспективы / Э.А. Петрович, М.З. Фрейдин // Вестн. Белорус. гос. сельскохоз. акад. – 2020. – № 3. – С. 244–254.
2. Solomon-Blackburn, R.M. A review of host major-gene resistance to Potato viruses X, Y, A, and V in potato: genes, genetics and mapped locations / R.M. Solomon-Blackburn, H.A. Barker // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – P. 8–16.
3. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы / С.С. Макарова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21, № 1. – С. 62–73.
4. Chandran, H. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Green Alternative for Sustainable Agriculture / H. Chandran, M. Meena, P. Swapnil // Sustainability. – 2021. – Vol. 13, № 19. – P. 10986.
5. Коломиец, Э.И. На службе биологической науке: институту микробиологии НАН Беларуси – 55 лет / Э.И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск, 2019. – Т. 13. – С. 3–7.
6. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 6. – С. 763–775.
7. Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) / И.В. Максимов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 1. – С. 19–34.
8. Blake, C. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis* / C. Blake, M. Nordgaard Christensen, A.T. Kovacs // MPMI. – 2021. – Vol. 34, № 1. – P. 15–25.
9. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой и жасмоновой кислотами на изменение протеома листьев картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и недостатке влаги / Л.Г. Ярулина [и др.] // Физиология растений. – 2022. – Т. 69, № 4. – С. 438–448.
10. Increasing Potato Sustainability to PVY under Water Deficiency by *Bacillus* Bacteria with Salicylic Acid and Methyl Jasmonate / J.N. Kalatskaja [et al.] // Int. J. Plant Biol. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 312–328.
11. Eichmann, R. Hormones as go-betweeners in plant microbiome assembly / R. Eichmann, L. Richards, P. Schäfer // Plant J. – 2021. – Vol. 105. – P. 518–541.

Микробные белки, индуцирующие неспецифическую системную устойчивость растений к болезням: достижения и перспективы использования в сельскохозяйственной практике

Карташов М.И., Чудакова К.А., Джавахия В.Г.

*Всероссийский НИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Россия,
электронный адрес: dzhavakhiya@yahoo.com*

Основным способом для защиты растений от болезней в современном растениеводстве является использование синтетических пестицидов, которые представляют собой ксенобиотики, оказывающие негативное действие на окружающую среду. В связи с этим становится актуальным постепенное замещение таких пестицидов более приемлемыми в экологическом плане средствами защиты растений. Среди них особое внимание в последнее время уделяется микробным белкам, вызывающим неспецифические защитные ответы растений. Интенсивные исследования молекулярных механизмов взаимодействия растений с фитопатогенами и непатогенными микроорганизмами привели к открытию целого ряда белков, индуцирующих системную устойчивость, таких как харпины, flag22, фактор элонгации Tu, элиситины и транскляминазы, ксиланазы, моноликоллин, гликопептиды с высоким содержанием маннозы, гликопротеины, эффекторы *Cladosporium fulvum*, CspD, белок Sm1, DI-протеин 42kDa, CS20EP и др. [1]. Для целого ряда микробных белков-индукторов описаны структуры и определены механизмы действия. И хотя этот список постоянно пополняется, арсенал белковых индукторов с подтвержденным защитным эффектом при их использовании в полевых условиях остается достаточно ограниченным. В то же время перспективность внедрения этих белков в системы интегрированной защиты растений не вызывает сомнений. В качестве одного из наиболее убедительных примеров может быть упомянут обнаруженный у *Alternaria tenuissima* белок PeaT1, индуцирующий устойчивость к вирусу табачной мозаики (ВТМ), который недавно был коммерциализирован в Китае в виде первого антивирусного препарата [2]. Другим индуктором болезнеустойчивости, который мог бы стать компонентом биопрепаратов, является обнаруженная нами у бактерии *Pseudomonas fluorescens* пептидил-пролил-цис/транс-изомераза (PPI-аза) FKBP-типа [3, 4]. Ее защитный эффект против фитофтороза и Y-вируса картофеля, против фузариоза, септориоза и ржавчины пшеницы, пирикулярноза риса, альтернариоза табака и ВТМ подтвержден многолетними вегетационными опытами и полевыми испытаниями.

В ходе этих исследований было обнаружено, что наряду с индуцирующей активностью РРI-аза обладает способностью стимулировать рост и развитие растений пшеницы в неблагоприятных для культуры условиях (при пониженных температурах). Так, предпосевное замачивание семян яровой пшеницы (сорта Дарья и Злата) в водных растворах этого белка (100 мг/л) и последующее послевсходовое опрыскивание ее проростков той же дозой, приводили к увеличению числа продуктивных (колосоносных) стеблей, размера колоса, увеличению биомассы растений и обеспечивали прибавку урожая свыше 10 %. Эти обработки не подавляли транспирацию, не вызывали снижения тургора листьев. Кроме того, у растений, обработанных РРI-азой на стадии кущения, увеличивалась скорость ассимиляции CO_2 (в среднем в 1,5 и 2,0 раза, по сравнению с контролем, уже на 2-е и 10-е сутки после опрыскивания соответственно), которая является важным фактором, определяющим интенсивность фотосинтеза и, в конечном счете, благополучие растений.

Полученные данные свидетельствуют о том, что защитные препараты, которые могли бы быть созданы на основе РРI-азы *P. fluorescens*, могут способствовать фотосинтетическим процессам, улучшая состояние обработанных растений и их устойчивость к абиотическим стрессам. Таким образом, у данного бактериального белка способность индуцировать неспецифическую системную устойчивость к фитопатогенам сочетается с его положительным влиянием на физиологию растений. Эта уникальная особенность РРI-азы, вероятно, может способствовать реализации максимальной продуктивности сельскохозяйственных культур и приводить к повышению их урожайности.

Все исследования, кроме определения скорости ассимиляции CO_2 , выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00154).

Список использованных источников

1. Microbial protein elicitors in plant defense / J.B. Joshi [et al.] // Microbial biocontrol: sustainable agriculture and phytopathogen management / ed. A. Kumar. – Springer, 2022. – Ch. 10. – P. 235–256.
2. Purification and expression of a protein elicitor from *Alternaria tenuissima* and elicitor-mediated defence responses in tobacco / J. Mao [et al.] // Ann. Appl. Biol. – 2010. – Vol. 156. – P. 411–420.
3. MF3 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) – an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens / D. Shumilina [et al.] // Phytopathologia Polonica. – 2006. – Vol. 41, № 1. – P. 39–49.
4. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests: pat. PCT WO2005/061533 A1 / V. Dzhavakhiya, A. Filipov, K. Skryabin et al. – Publ. 07.07.2005.

Скрининг азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий, стимулирующих рост и развитие растений сахарной свеклы

Картыжова Л.Е., Ананьева И.Н., Клишевич Н.Г., Алещенкова З.М.

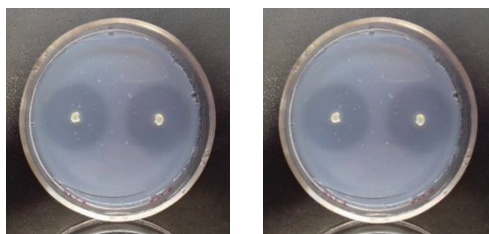
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: ananewa_irina@mail.ru

В современных условиях развития растениеводства особую актуальность приобретает применение микроорганизмов, повышающих продуктивность сельскохозяйственных культур. Использование в агроэкосистемах свекловичных севооборотов ризосферных азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий позволит снизить расход минеральных удобрений, повысить уровень экологической безопасности растениеводческой продукции и обеспечить высокую урожайность культуры.

Цель работы – выделение азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий, увеличивающих обеспеченность растений сахарной свеклы азотом и фосфором.

Из ризосферы и ризопланы сахарной свеклы выделены азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии (25 и 16 изолятов соответственно). Олигонитрофильные изоляты, выделенные на среде Эшби, были проверены на способность к азотфиксации [1]. Установлено, что шесть изолятов способны фиксировать азот, максимальная нитрогеназная активность установлена у бактерий *BN* КС-61 (28,5 нм C_2H_4 /фл./3 сут) и *BN* КС-62 (20,0 нм C_2H_4 /фл./3 сут).

Отбор активных фосфатмобилизующих бактерий проводили на основании способности изолятов солюбилизовать фосфаты кальция и образовывать зоны «галло» на среде Муромцева [2]. Из 16 фосфатмобилизующих изолятов максимальная зона «галло» отмечена у изолята *BPh* 11 – 14 мм, индекс солюбулизации – 7,7, и у изолята *PC* 1, составившая 13 мм, индекс солюбулизации – 7,5 (рис. 1).



Изолят *BPh* 11

Изолят *PC* 1

Рис. 1. Фосфатсолюбилизирующая способность изолятов бактерий

Ізучэнне ўплыву найбольш актывных ізолятаў на рост і развіццё расцельнай сахараўнай свеклы праводзілі ў ўмовах *in vitro*. Семеа сахараўнай свеклы інокуліравалі 2 % культуральнай жідкасцю бактэрыяў і павешчалі на агарызаванную сроду Jensen [3]. Максімальны стымуліруючы эфэкт на развіццё праросткаў расцельнай ўстаноўлены пры іспользаванні ізолятаў *BN KC-61* і *PC 1* (рыс. 2). Высота праросткаў ў варыянтах з інокуляцыяй семейнаў ўзвельчылася на 30 і 26 % саотвештвенна па сраўненню з кантралем (вода).



К ізолят *BN KC-61*



К ізолят *PC 1*

Рис. 2. Влывне інокуляцыі семейнаў сахараўнай свеклы ізолятамі бактэрыяў на развіццё праросткаў

Такім абразам, ўстаноўлена, што азотфіксуруючы ізолят *BN KC-61* і фосфатмобілізуеы *PC 1* абеспечываюць ростстымуліруючы эфэкт і перспектывны для іспользавання ў якасцве асновы мікробнага прэпарата для ўлучшэння росту, развіцця і павышэння прадуктывнасці сахараўнай свеклы.

Спісок іспользаваных істочнікаў

1. Теппер, Е.З. Практыкум па мікробіалогіі / Е.З. Теппер, В.К. Шільнікова, Г.І. Переверзева. – М. : ДРОФА, 2004. – 256 с.
2. Методы пачвеннай мікробіалогіі і біохіміі : учеб. пособие / под ред. Д.Г. Звягінцева. – М. : МГУ, 1991. – 304 с.
3. Jensen, H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia / H.L. Jensen // Proc. Linn. Soc NSW. – 1942. – Vol. 66. – P. 98–108.

Ультроструктурные взаимоотношения эндофитных бактерий рода *Bacillus* с корневыми клетками лука *Allium cepa*

Касторнов А.А., Петров С.А., Нарушко М.В., Бажин А.С., Субботин А.М.

ФГБУН ФИЦ ТюмНЦ СО РАН, Тюмень, Россия,
электронный адрес: AlexKastornov@yandex.ru

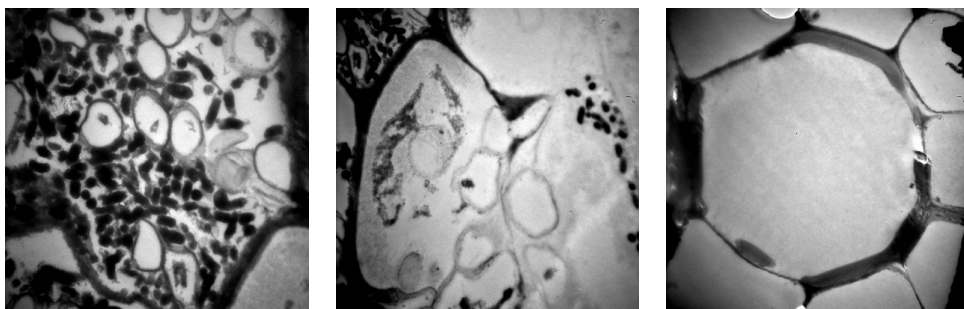
Ассоциации растений с микроорганизмами из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние, привлекают внимание ученых с точки зрения не только изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и как перспективный биотехнологический ресурс в адаптивном растениеводстве. Известен штамм *Bacillus cereus* 875 TS, который используется в качестве средства повышения продуктивности растений и может быть использован для стимуляции роста растений и фотосинтеза [1]. Однако остается неизвестным взаимоотношение его с растением. В результате этого создание новых микробиологических препаратов для адаптивного растениеводства на основе *Bacillus cereus* 875 TS затрудняется.

Цель работы – с использованием электронной микроскопии выявить ультроструктурные взаимоотношения и возможные механизмы влияния *Bacillus cereus* 875 TS на повышение продуктивности лука *Allium cepa*.

Объектом исследования служили корни лука *Allium cepa* сорта Центурион F1. Микроорганизмы были взяты из отложений верхнего и среднего плейстоцена IV морской террасы (mIII1, mII2-4) в районе г. Тарко-Сале. В работе использовали бактерии рода *Bacillus* (штамм 875 TS), зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (регистрационный номер ВКПМ: В-12 242). Бактерии культивировали 48 часов на скошенном питательном агаре (ГРМ– агар, Оболенск. ТУ 9398-020-780 956- 2006) при $t = 36$ °С. Затем микроорганизмы отмывали 5 мл дистиллированной воды. В эксперименте использовалась концентрация $1 \cdot 10^5$ микробных клеток в 10 мл дистиллированной воды, в которых выращивали лук в фитотроне при температуре 25 °С и относительной влажности воздуха 27 %. На 20-е сутки с помощью стандартной методики просвечивающей электронной микроскопии [4] с использованием электронного микроскопа Jeol JEM-1011 («JEOL», Япония) и ультрамикротомы Leica EM UC7 (Германия) нами была рассмотрена ультроструктурная организация *Bacillus cereus* 875 TS.

Показано, что данные микроорганизмы проникают внутрь растения (см. рисунок, а) и являются эндофитными бактериями. При этом находятся не только в межклеточном пространстве, но и внутри корневых клеток.

На рисунке, б отчетливо видны ультроструктурные признаки апоптоза, проявляющиеся в отделении клетки от соседних клеток, нарушением меж-



а б в
Микроорганизмы рода *Bacillus* внутри корня лука *Allium cepa*.
Ускоряющее напряжение 80 kV, увеличение 60 000x

клеточных взаимодействий. Таким образом, бактерии *Bacillus cereus* 875 TS индуцируют апоптотические явления у растений, тем самым способствуют формированию корневых каналов растения (см. рисунок, в), способствующие поступлению питательных (минеральных) веществ.

Апоптоз является интегральной частью процесса развития растений и представляет собой генетически детерминированную программу смерти клеток [2]. Более того, апоптоз – это один из фундаментальных процессов в жизни клеток организмов, находящихся на самом различном уровне эволюционного развития [3].

Bacillus cereus 875 TS из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние, является средством для повышения продуктивности растений, индуцирует процесс апоптоза для формирования корневых каналов растения и тем самым стимулирует физиологические свойства растений, их рост и возможно фотосинтез.

Исследования выполнялись согласно Государственному заданию на 2021–2030 годы «Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата» (Приоритетное направление 1.5.11. Программа 1.5.11.1).

Список использованных источников

1. Штамм микроорганизма *Bacillus cereus* 875 TS в качестве средства повышения продуктивности растений : пат. 2 624 032, Рос. Федерация / А.М. Субботин, С.А. Петров, М.В. Нарушко [и др.] – № 2016114388; заявл. 13.04.2016; опубл. 30.06.2017; бюл. № 19.
2. Ванюшин, Б.Ф. Апоптоз у растений / Б.Ф. Ванюшин // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
3. Скибо, Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели : учеб.-метод. пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» / Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова. – Казань : ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.
4. Электронномикроскопическое исследование поверхности спор бацилл / Т.А. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 6. – С. 698–706.

Получение изолята *Coprinellus domesticus* через накопительную культуру и изучение особенностей его культивирования как перспективного микоризообразователя

Константинов А.В.¹, Хархасова И.А.¹, Пантелеев С.В.¹, Острикова М.Я.¹,
Козлова О.В.²

¹Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь,
электронный адрес: avkonstantinof@mail.ru

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Возможность вступления в симбиоз с почвенными грибами распространена очень широко и выявлена у большого числа растений, в первую очередь представителей *Pinaceae* Lindl. и *Orchidaceae* Juss.[1]. Значение микотрофности заключается в оптимизации минерального питания и водного обмена, в первую очередь на бедных субстратах, а на начальных этапах онтогенеза семян микориза способствует повышению приживаемости и может выступать существенным показателем качества посадочного материала. Микоризные грибы во многих случаях не являются специфичными для растений-хозяев. Так показано, что один вид орхидных способен образовывать микоризу с целым комплексом видов грибов, находящихся на корнях одновременно [1, 2].

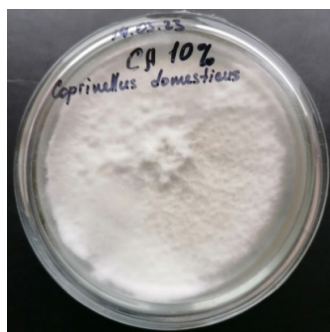
Возможность использования искусственной микоризации применительно к хвойным породам и разным группам орхидных представляет большой научный и практический интерес. Среди грибов, ассоциированных с корнями вышеуказанных растений, следует отметить виды рода *Coprinellus* P. Karst. (1879) [3], в частности *Coprinellus domesticus*, получение чистой культуры и изучение культуральных особенностей которого являлось целью наших исследований.

Исходным материалом служили двух- и четырехлетние растения сосны обыкновенной, отобранные в лесных культурах Корневской ЭЛБ Института леса НАН Беларуси (10С, 2020 г., квартал 414, выделе 12).

В лабораторных условиях проводили отмывание корней семян под проточной водой и под биноклем отбирали фрагменты с микоризными окончаниями белого и бледно-розового цвета. В условиях ламинар-боксов отрезки корней размерами 0,5–2,5 см стерилизовали 30 с в 70%-ном этаноле и промывали в стерильной дистиллированной воде для снижения бактериальной контаминации. Далее помещали в колбы объемом 100 мл, слегка заглубляя в субстрат из зерна овса, отваренного в течение 1 ч и дополненного мелом и доломитовой мукой (по 1 г на 0,5 л подсушенного зерна). Субстрат автоклавировали 30 мин при 0,5 атм (112 °С). Культивирование проводили в термостате на протяжении 12 сут при температуре 24 °С. Подготовку лабораторной посуды и инструментов, выделение и пересев чистых культур проводили согласно общепринятым методикам работы в асептических условиях.

На пятые сутки отметили появление первых признаков роста мицелия белого цвета, сначала нитчатого, далее уплотняющегося. Кроме целевой культуры выявляли контаминирующие микромицеты, черной, зеленовато-бурой и желтовато-зеленой окрасок. Материал с отдельных колоний в пристеночных слоях субстрата пересевали в качестве изолятов, одновременно отбирая мицелий для молекулярно-генетического анализа. В ходе амплификации маркерного региона рДНК (ITS1) с праймерами ITS1F/ITS2 и секвенирования ПЦР-продуктов по Сэнгеру (на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems), одна из культур была идентифицирована в базе данных NCBI как базидиомицет *Coprinellus domesticus* (Bolton) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson. Выявленный изолят был депонирован в NCBI с присвоением номера OQ694595.

В течение трех пассажей по 15–18 сут чистую культуру поддерживали на зерновом субстрате и параллельно переводили на плотную сусло-агаровую среду (4 %, pH = 5,7). Скрининг сред для поддержания изолята *C. domesticus* показал возможность культивирования на 10%-ном сусло-агаре (см. рисунок), картофеле-глюкозном агаре. Продолжительность выращивания на среде Сабуро, была ограничена в связи с наступлением лизиса мицелия после 12–15 сут.



а



б



в

Чистая культура *Coprinellus domesticus* на питательной среде (а);
 мицелий на субстратах из овсяного зерна (б); листового опада и торфа (в)

В ходе наработки биомассы гриба на естественных субстратах *in vitro*, выявлен интенсивный рост мицелия на овсяном зерне, листовом опаде, а также их смесях в различных соотношениях с нейтрализованным верховым торфом марки «Двина», при посеве *C. domesticus* сосуды объемом 100 мл, полное обрастание наступало на 10–17-е сут.

Таким образом, из микосферы сосны обыкновенной нами был выделен изолят навозника домашнего. Изучение ростовых параметров мицелия показало возможность его дальнейшего использования при инокуляции почвенных субстратов, предназначенных для выращивания посадочного материала хвойных пород деревьев и адаптации микроклонов орхидей.

Список использованных источников

1. Egger, K.N. The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas / K.N. Egger, D.S. Hibbett // *Canadian Journal of Botany*. – 2004. – Vol. 82 (8). – P. 1110–1121.
2. Finlay, R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles / R.D. Finlay // *Mycologist*. – 2004. – Vol. 18 (2). – P. 91–96.
3. Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland / A. Menkis [et al.] // *Plant pathology*. – 2006. – Vol. 55 (1). – P. 117–129.

Стимуляция наночастицами железа процесса темновой ферментации сельскохозяйственных отходов с образованием биоводорода

Лайкова А.А.^{1,2}, Потехина М.А.^{1,3}, Литти Ю.В.¹

¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия, электронный адрес: laykova2011@yandex.ru

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Темновая ферментация (ТФ) – экологически чистый метод утилизации органических отходов, позволяющий снизить нагрузку на окружающую среду. Основным продуктом данного процесса является водород, используемый в качестве газообразного топлива. Актуальной в настоящее время является переработка сточных вод, пищевых и сельскохозяйственных отходов, постоянно образующихся в больших количествах на производствах. Гидролитические и ацидогенные микроорганизмы, участвующие в ТФ, разлагают биополимеры с образованием более простых соединений, в частности, водорода. Поскольку биоводород является экологически чистым энергоносителем, многие исследования сосредоточены на оптимизации его получения. Эффективным способом повышения продукции водорода является предварительная обработка субстрата физическими или химическими методами с целью инактивации или снижения активности водородпотребляющих микроорганизмов, а также оптимизация соотношения C/N за счет совместного сбраживания субстратов различной природы. Добавление в среду культивирования частиц или растворимых соединений металлов, в том числе, железа, является известным методом усиления гидрогеназной активности и, следовательно, стимуляции продукции водорода [1, 2]. В качестве активных продуцентов водорода могут выступать как чистые, так и смешанные культуры микроорганизмов. Использование монокультур или обогащение сообщества позволяет обеспечить стабильность системы и высокий выход водорода [3].

Цель работы – определение наилучших параметров темновой ферментации смеси сельскохозяйственных отходов (соломы и свиного навоза) монокультурой *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* SP-H2, включающих предобработку, совместное сбраживание и усиление гидрогеназной активности за счет подбора оптимальной железосодержащей добавки. На первом этапе было выявлено оптимальное соотношение компонентов субстрата (свиного навоза

и соломы) при совместном сбраживании, изучена эффективность физической (тепловая обработка) и химической (добавление хлороформа и 2-бромэтансульфоната (BES)) предобработки субстрата для последующей ферментации бактерией *T. thermosaccharolyticum* SP-H2. На втором этапе эксперимента для образца с наилучшими показателями ТФ была определена эффективная комбинация концентрации и соединения железа (нулевалентного железа, магнетита и гематита). Оптимальное соотношение соломы и свиного навоза составило 66:33 при тепловой предобработке (105°C). Максимальный выход биоводорода составил 22,6 мл H₂/г ОВ. Анализ микробного сообщества проб с различным соотношением С/Н и предобработкой показал разнообразие типичных ацидогенных, гидролитических и синтрофных представителей (*Herbinix*, *Clostridium sensu stricto* 1, *Ureibacillus*, *Tepidimicrobium* и др.), что указывает на активное биоразложение лигноцеллюлозного субстрата. Для эксперимента по улучшению продукции водорода железом была использована серия концентраций нулевалентного железа, магнетита и гематита равная 50, 100, 200, 400 и 800 мг/л. Наилучший выход водорода был получен при добавлении 200 мг/л наночастиц нулевалентного железа и составил 13,01 мл H₂/г ОВ. Вышеперечисленные методы оптимизации темновой ферментации, такие как совместное сбраживание соломы и свиного навоза в соотношении 66:33, тепловая предобработка субстрата и внесение 200 мг/л частиц Fe⁰ способствуют эффективной утилизации сельскохозяйственных отходов с повышенным выходом биоводорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках проекта № 13.2251.21.0173 (идентификационный номер RF-2251.61 322X0 051).

Список использованных источников

1. Promoting dark fermentation for biohydrogen production: potential roles of iron-based additives / Y. Ren [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy. – 2022. – Vol. 47, № 3. – P. 1499–1515.
2. Investigating the effects of iron and nickel nanoparticles on dark hydrogen fermentation from starch using central composite design / M. Taherdanak [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy. – 2015. – Vol. 40, № 38. – P. 12956–12963.
3. Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects / J.F. Soares [et al.] // Renew. Sustain. Energy Rev. – 2020. – Vol. 117. – P. 109–484.

Выделение спорообразующих бактерий рода *Bacillus* из микробиома рубца жвачных животных и их идентификация

Летвинова В.С.¹, Барейко А.А.², Раевская Е.А.³, Сверчкова Н.В.¹

¹Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь, электронный адрес: miranikki@yandex.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке и изучению эффективности использования в кормопроизводстве биопрепаратов, обладающих пробиотическим действием, основу которых составляют бактерии рода *Bacillus*, выделенные из рубца жвачных животных. Используемые штаммы функционально адаптированы к условиям пищеварительного тракта крупного рогатого скота, способны оказывать многоплановое воздействие на здоровье и метаболизм животных, способствуя нормализации рубцового пищеварения [1].

Цель работы – выделение и видовая идентификация высокоактивных штаммов спорообразующих бактерий с антимикробной и ферментативной активностью из рубца жвачных животных.

Получение накопительных культур штаммов бактерий с целлюлолитической активностью осуществляли в селективной питательной среде с добавлением 2–3 полосок фильтровальной бумаги в течение двух недель [2]. Затем высевали 100 мкл накопительной культуры на плотную питательную среду с Na-КМЦ. Изоляты с высокой целлюлолитической активностью отбирали по зонам просветления агара, обработанного 0,1%-ным красителем Конго красным. Видовую принадлежность штаммов определяли на основании изучения культурально-морфологических особенностей и ПЦР-анализа. Выделение тотальной ДНК штаммов проводили методом ЦТАБ/ДСН. Для идентификации бактерий видов *B. velezensis* и *B. licheniformis* применяли праймеры Z9-5F (5'-ggctcgtagcacaatagacc-3'), Z9-5R (5'-agcgtgttaggtgcttga-3') и 177F1 (5'-cgtagcctgatatcagcat-3'), 304R1 (5'-gcaggaacatcgacttc-3') соответственно [2]. Продукты ПЦР анализировали в 1,5%-ном агарозном геле. Изучение продукции внеклеточных ферментов идентифицированными штаммами проводили чашечным методом на средах с соответствующими субстратами. Антагонистическую активность оценивали методом лунок.

Среди изолятов, полученных методом накопительных культур, были отобраны три высокоактивные штамма спорообразующих бактерий, обладающих

целлюлолитической активностью. Изучение их культурально-морфологических свойств показало, что штаммы С 2.1 и Л 1.3 имеют слизистые колонии молочного цвета неправильной формы с морщинистой поверхностью, контур края ворсинчатый. Клетки палочковидные, с центральным расположением спор; по Граму окрашиваются положительно. Штамм Л 1.4 имеет гладкие округлые колонии молочного цвета с ризоидным краем. Клетки палочковидные, грамположительные (рис. 1).

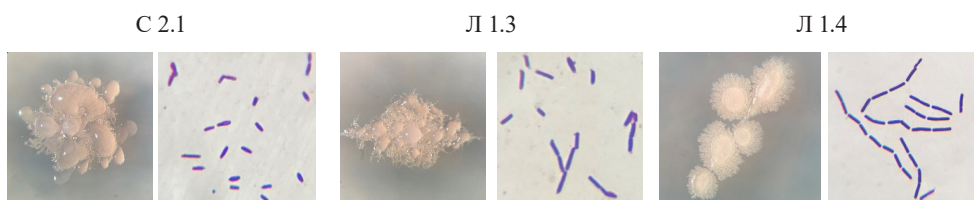


Рис. 1. Морфологические свойства штаммов бактерий рода *Bacillus*

Проведение ПЦР с видоспецифичными праймерами подтвердило, что штаммы Л 1.3 и С 2.1 относятся к виду *Bacillus licheniformis*, штамм Л 1.4 – к *Bacillus velezensis* (рис. 2).

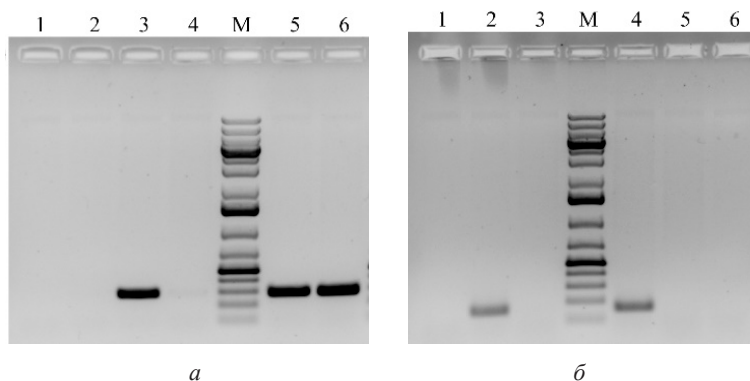


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР с видоспецифичными праймерами для детекции *B. velezensis* (а) и *B. licheniformis* (б): 1 – отрицательный контроль (без ДНК); 2 – штамм Л 1.3; 3 – штамм Л 1.4; 4 – штамм С 2.1 (положительный контроль для *B. licheniformis*); 5 – *B. velezensis* БИМ В-497 Д (положительный контроль для *B. velezensis*); М – маркер молекулярной массы ДНК «GeneRuler DNA Ladders 1 kb Plus»

У штаммов выявлено наличие комплексной ферментативной (целлюлазной, липазной, протеазной, амилазной и каталазной) и антагонистической активности к условно-патогенным бактериям (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella dublin*, *Pseudomonas syringae*), что делает их перспективными биологическими агентами для создания пробиотических препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. A buffalo rumen-derived probiotic (SN-6) could effectively increase simmental growth performance by regulating fecal microbiota and metabolism / S. Yang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – № 13:935 884. doi: [org/10.3389/fmicb.2022.935 884](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.935884)
2. Isolation of cellulolytic bacterial strains from *Rangifer tarandus* rumen microflora / A. Dubrovin [et al.] // Annual 25th Internat. Scientific Conf. Proceedings «Research for Rural Development 2019», Jelgava, 15–17 May 2019 / Latvia Univer. of Life Sciences and Technologies ; ed.: S. Treija, S. Skujeniece. – Jelgava, 2019. – Vol. 1. – P. 265–268.

Определение доминирующих таксонов микробиоты рубца лактирующих коров

Летвинова В.С.¹, Барейко А.А.², Сидоренко А.В.², Сверчкова Н.В.¹,
Романович Ж.В.³, Саханчук А.И.³

¹ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: gpro@biotech.bas-net.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству», Жодино, Беларусь

Известно, что здоровье и молочная продуктивность коров во многом зависят от качественного и количественного состава микробиоты рубца, регулировать который можно с помощью правильно подобранного рациона и его обогащения пробиотическими кормовыми добавками. Профилактика и своевременное устранение нарушений рубцового микробиома помогают значительно сократить производственные потери, обусловленные плохой усвояемостью кормов, болезнями животных, снижением количества и качества получаемого молока. Все вышеизложенное обуславливает актуальность и практическую значимость исследований, направленных на разработку системы мер для регуляции состава микробиома рубца с целью повышения продуктивности молочного скота.

С помощью ПЦР в режиме реального времени исследована динамика микробиоты рубца лактирующих коров после введения в рацион комбинации пробиотических кормовых добавок «Споробакт-К» и «Румибакт» (в течение 1 месяца). Анализировали количественное содержание грамтрицательных бактерий отдела *Bacteroidota* (синоним *Bacteroidetes*) и грамположительных бактерий отдела *Bacillota* (синоним *Firmicutes*); условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*; целлюлолитических бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus licheniformis*; амилолитических бактерий *Lactobacillus* sp., *Prevotella albensis*, лактатутилизирующих бактерий *Selenomonas ruminantium*. Согласно литературным источникам, изменение относительной численности данных бактерий коррелирует с развитием лактатного ацидоза [1–3].

Изменение численности бактерий отделов *Bacillota* и *Bacteroidota* у животных экспериментальной группы значительно варьировало и носило индивидуальный характер. Однако ни у одной из коров не отмечено увеличения численности бактерий отдела *Bacillota* при снижении численности бактерий отдела *Bacteroidota*, которое рассматривается как прогностический маркер развития лактатного ацидоза. Что касается коров контрольной группы, у всех животных наблюдалось увеличение численности бактерий отдела *Bacillota*, при этом численность представителей отдела *Bacteroidota* увеличивалась или снижалась.

Количество условно-патогенных бактерий *E. coli*, высокую численность которых рассматривают в качестве фактора, способствующего возникновению ацидоза рубца, у коров как экспериментальной, так и контрольной группы в период исследования существенно снижалось ($p < 0,05$). Численность условно-патогенных бактерии *S. aureus* также снижалась как у животных экспериментальной, так и контрольной групп ($p < 0,05$). Условно-патогенные бактерии *E. faecalis* у коров экспериментальной и контрольной групп не детектировались как до, так и после 1 месяца кормления комбинацией пробиотических добавок.

Количество бактерий группы *B. amyloliquefaciens*, которые играют важную роль в утилизации целлюлозо- и крахмалосодержащих растительных субстратов, у животных экспериментальной группы после 1 месяца кормления комбинацией пробиотических добавок «Споробакт-К» и «Румибакт» достоверно снижалось ($p < 0,05$). Снижение численности *B. amyloliquefaciens* наблюдалось и у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Относительное содержание другого вида бацилл с высокой гидролитической активностью – *B. licheniformis* – оставалось стабильным как у животных контрольной, так и экспериментальной группы.

В качестве фактора риска развития острого ацидоза рассматривают высокое содержание в рубце амилитических бактерий *Lactobacillus* и *Prevotella*, которые утилизируют крахмал и промежуточные продукты его расщепления с образованием органических кислот (в первую очередь молочной). Количество бактерий рода *Lactobacillus* у большинства животных контрольной и опытной групп в период исследования увеличивалось. Относительное содержание *P. albensis* снижалось у большинства коров экспериментальной группы, а у коров контрольной группы либо не изменялось, либо снижалось.

Увеличение в рубце численности лактатутилизирующих бактерий, в первую очередь *S. ruminantium*, препятствует развитию лактатного ацидоза у крупного рогатого скота. Численность *S. ruminantium* у всех животных контрольной и большинства животных экспериментальной групп оставалась стабильной.

Представленные данные свидетельствуют, что при включении в рацион комбинации пробиотических кормовых добавок «Споробакт-К» и «Румибакт» лактатный ацидоз – заболевание, вызванное неправильным кормлением, у исследуемой группы лактирующих коров не развивается.

Список использованных источников

1. Мирошникова, М.С. Основные представители микробиома рубца / М.С. Мирошникова // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, № 4. – С. 174–185.
2. Лаптев, Г.Ю. Микробиом рубца – основа здоровья коров / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Йылдырым, Л.А. Ильина // Животноводство России. – 2020. – № 4. – С. 42–45.
3. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid / М.А. Cobos [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2011. – Vol. 90. – P. 26–30.

Иммобилизованные клетки и ферменты бактерий, обладающих гидролитической активностью, для целей сельского хозяйства

Максимов А.Ю.^{1,2}, Пьянкова Е.В.^{1,2}, Елисеева А.Д.², Щетко В.А.³,
Максимова Ю.Г.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия, электронный адрес: almaks1@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Микроорганизмы – продуценты гидролитических ферментов и выделенные ферменты широко используются в различных отраслях промышленности, главным образом пищевой, химической, фармацевтической, а также в кормопроизводстве и сельском хозяйстве. Для стабилизации активности, повышения устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды и сроков хранения препаратов используют иммобилизацию биокатализаторов – ограничение подвижности ферментов или каталитически активных клеток в среде [1].

Цель работы – поиск наиболее эффективного способа иммобилизации липаз и амилаз, а также их продуцентов.

Иммобилизовали клетки бактериальных штаммов, ранее выделенных нами из содового шлама и грунта содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод»: *Bacillus aequororis* 5-ДБ (ВКМ В-3610D), *Microbacterium kitamiense* 16-ДБ (ВКМ Ас-2919D), *Pseudomonas peli* 3-Т (ВКМ В-3617D), обладающих липазной и амилазной активностями [2], методом адсорбции и включением в структуру гелей. Выделяли липазу и иммобилизовали на карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), активированном хитозане и кормовых дрожжах. Определяли липазную активность сразу после иммобилизации и после высушивания и хранения.

Установлено, что активность у иммобилизованных клеток сохранялась в большей мере, чем активность иммобилизованного фермента, по сравнению с нативным биокатализатором. Наибольшая активность после иммобилизации сохранялась у клеток *P. peli* 3-Т в структуре геля агарозы и альгината бария, при этом сохранялось более 50 % активности биокатализатора. Трансформировали субстрат на протяжении 4 и 5 циклов соответственно (см. таблицу).

Фермент, иммобилизованный на КМЦ, терял свою активность. При иммобилизации липазы *B. aequororis* 5-ДБ на активированном хитозане и кормовых дрожжах активность значительно снижалась, но после высушивания

Сохранение активности иммобилизованных биокатализаторов

Штамм	Фермент	Биокатализатор / Метод иммобилизации	%		Количество циклов*
			1	2	
<i>P. peli</i> 3-T	Липаза	Клетки / включение в гель Агарозы	63,8	–	4
		Клетки / включение в гель Альгината бария	47,9	–	5
		Клетки / адсорбция на каолине	42,6	–	–
		Фермент / ковалентная сшивка С активированным хитозаном	3,2	3,3	–
		Фермент / адсорбция на дрожжах	2,7	2,0	–
<i>M. kitamiense</i> 16-ДБ	Амилаза	Клетки / ковалентная сшивка С активированным хитозаном	3,5	–	–
		Клетки / адсорбция на каолине	2,8	–	–
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ	Липаза	Клетки / адсорбция на каолине	42,5	–	–
		Фермент / ковалентная сшивка С активированным хитозаном	11,3	46,0	–
		Фермент / адсорбция на дрожжах	10,4	64,2	–
	Амилаза	Клетки / адсорбция на каолине	90,7	–	–

Пр и м е ч а н и е. 1 – сохранение активности сразу после иммобилизации; 2 – после высушивания иммобилизованного препарата; * – с сохранением не менее 50 % активности

возрастала. Возможно, при регидратации гранул фермент выходил в раствор, что приводило к снижению диффузионных затруднений при массообмене субстрата и продукта, и, в свою очередь, к увеличению скорости ферментативной реакции.

Таким образом, наименьшее снижение активности наблюдается при иммобилизации целых клеток, обладающих гидролитической активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Список использованных источников

1. Eş, I. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application / I. Eş, J.D.G. Vieira, A.C. Amaral // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99. – P. 2065–2082.
2. Шилова, А.В. Выделение и идентификация алкалолотерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155–165.

Разработка систем защиты картофеля в условиях Анапо-Таманской зоны Краснодарского края

Маскаленко О.А., Глушков С.М.

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»,
Краснодар, Россия,
электронный адрес: s.nekoval@yandex.ru

Системы защиты растений на основе биологических препаратов эффективно внедряются в технологии выращивания сельскохозяйственных культур в условиях Краснодарского края [1–3].

Нами разработана и апробирована в 2021–2022 гг. в полевых условиях Темрюкского района Краснодарского края, в период вегетации культуры, система защиты картофеля сорта Коломбо.

Рекомендованная система защиты картофеля состояла из препаратов компании ООО «Биотехагро», химическая, принятая в хозяйстве – из различных пестицидов, разрешенных к применению на территории РФ [4]. На контрольном участке средства защиты растений не использовали.

В результате было отмечено, что биологические препараты оказали благотворное влияние на рост количества супрессивных микомицетов в почвенном биоценозе. При этом наблюдалась менее интенсивная пораженность растений *Alternaria* spp. и *Fusarium* spp., по сравнению с контролем и вариантом с применением системы химической защиты картофеля.

В варианте опыта с биологической защитой выявлено более интенсивное формирование вегетативной биомассы растений картофеля, а также наибольшая масса одного товарного клубня. Общая масса товарных клубней с куста была больше, а их количество с растения меньше, по сравнению с вариантом с применением химической защиты.

Качественные характеристики клубней картофеля были удовлетворительными для обоих вариантов, в сравнении с контролем. Однако увеличение урожайности и содержания крахмала в клубнях отмечено только в варианте с биологической защитой.

Список использованных источников

1. Анцупова, Т.Е. Эффективность различных систем защиты томата от болезней в условиях Анапо-Таманской агроклиматической зоны Краснодарского края / Т.Е. Анцупова, С.Н. Нековаль, А.Е. Садовая // Тр. Кубан. гос. аграр. ун-та. – 2022. – № 95. – С. 61–68.
2. Применение интегрированной и биологической систем защиты при выращивании арбуза / М.Н. Чернякович [и др.] // Науч. тр. Северо-Кавказ. федер. науч. центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2022. – Т. 35. – С. 103–105. – Doi: 10.30679/2587-9847-2022-35-103-105. – EDN ALVWGD.

3. Нековаль, С.Н. Биопрепаратами защищать картофель эффективнее / С.Н. Нековаль // Аграрная наука. – 2020. – № 7–8. – С. 115–117.

4. «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов по состоянию на 21 февраля 2022 г.» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://msh.krasnodar.ru/activity/napravleniya-deyatelnosti/rastenievodstvo/gosudarstvennyy-katalog-pestitsidov-i-agrokhimikatov-razreshennykh-k-primeneniyu-na-territorii-rossi/211436>. – Дата доступа: 09.03.2023.

«Селекорд-2000» – новый селенсодержащий кормовой продукт для птицеводства яичного направления

Мороз И.В.¹, Ромашко А.К.², Павлюк А.Н.¹, Сенько А.Д.²,
Лобанок А.Г.¹, Сапунова Л.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: leonida@mbio.bas-net.by

²РУП «Опытная научная станция по птицеводству», Заславль, Беларусь

Приоритетной задачей яичного птицеводства наряду с повышением конкурентоспособности, увеличением объемов производства яиц при максимальном снижении затрат является улучшение их товарных качеств и биологической ценности. Например, производство яиц с заданными потребительскими свойствами и, в частности, обогащенных селеном. Селен – жизненно важный микроэлемент, который участвует в регуляции обмена веществ, в окислительно-восстановительных процессах, обладает антиоксидантными свойствами, влияет на синтез и активность ферментов, процессы тканевого дыхания и иммунобиологическую активность организма. Микроэлемент поступает в организм с пищей и водой, что при дефиците в почвах Беларуси обуславливает и его недостаток в основных продуктах питания. Для профилактики дефицита селена рекомендуется включать в рацион обогащенные микроэлементом продукты питания [1–4].

В Институте микробиологии НАН Беларуси создана первая отечественная биотехнология получения обогащенных селеном кормовых дрожжей «Селекорд-2000». Разработана научно-техническая документация, необходимая для реализации их производства, изготовлены лабораторные образцы и опытные партии, проведены производственные испытания.

Кормовые дрожжи «Селекорд-2000» содержат 2000 мг Se/кг в составе инактивированных клеток адаптированного к селену и запатентованного штамма дрожжевого гриба *Candida stellimalicola*. Штамм непатогенен и безвреден для лабораторных животных, не проявляет токсических, аллергенных и токсигенных свойств, а содержащие его дрожжи «Селекорд-2000» по параметрам острой оральной токсичности относятся к 4-му классу опасности (вещества малоопасные).

Испытания эффективности действия нового селенсодержащего кормового продукта проведены в отделе кормления РУП «Опытная научная станция по птицеводству» и на базе филиала ОАО «1-я Минская птицефабрика». Установлено, что введение в рацион комбикормов, изготовленных с использованием «Селекорд-2000» в дозе 625–750 мг Se/т, не оказывает негативного влияния на жизнеспособность ремонтного молодняка кур яичных кроссов в первую

фазу выращивания и среднесуточное потребление им корма. Однако цыплята опытных групп в отличие от птицы контрольной группы, получавшей комбикорм с селенитом натрия, обладали меньшей, хотя и соответствующей нормативу, живой массой и меньшим среднесуточным приростом. При этом показатель выравненности стада у цыплят опытной группы, потреблявшей 750 мг Se/т, был более высоким, чем в контроле.

Установлено, что замена в рационе кур-несушек селенита натрия дрожжами «Селекорд-2000» способствовала увеличению средней массы яиц, улучшению их морфологических показателей, повышению выхода яичной массы, увеличению числа яиц высоких ценовых категорий, снижению конверсии корма и количества нетоварного яйца. Выявлено также увеличение содержания в яйце белка, витамина А, каротиноидов. Содержание селена в яйцах от несушек, потреблявших комбикорма с дрожжами «Селекорд-2000», составляло 20,50–31,28 мкг/100 г и не уступало показателям представленной на рынке Беларуси аналогичной отечественной продукции, производимой с использованием импортируемых селеносодержащих кормовых добавок. Кроме того, введение в рацион дрожжей «Селекорд-2000» сопровождалось снижением уровня аспаратаминотрансферазы и прямого билирубина в крови кур-несушек, что свидетельствует об улучшении состояния их печени, а также мочевой кислоты, что существенно снижает риск возникновения подагры.

Таким образом, использование дрожжей «Селекорд-2000» в рационе кур-несушек позволяет не только улучшить их физическое здоровье, но и обогатить яйцо селеном, что делает его продуктом функционального питания. Важной задачей является освоение опытно-промышленного производства востребованного кормового продукта с целью удовлетворения внутреннего спроса, импортозамещения и экономии валютных средств на закупку зарубежных аналогов, а также экспорта в страны Евразийского экономического сообщества.

Список использованных источников

1. Ермаков, В.В. Биологическое значение селена / В.В. Ермаков, В.В. Ковальский. – М. : Наука, 1974. – 298 с.
2. Lyons, M.P. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature – Review / M.P. Lyons, T.T. Papazyan, P.F. Surai // *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* – 2007. – Vol. 20, № 7. – P. 1135–1155.
3. Esmacili, S. Selenium-enriched yeast as selenium source for nutritional purpose / S. Esmacili, K. Khosravi-Darani // *Curr. Nutr. Food Sci.* – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 49–56.
4. Kieliszek, M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food / M. Kieliszek // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, № 7. – P. 1298. doi: org/10.3390/molecules 24 071 298

Бактерии, перспективные для включения в состав препарата для консервирования бобовых трав

Найденко И.А., Денисенко В.В., Сафонова М.Е.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by*

Прочная кормовая база является основой эффективности современного животноводства. В рационах животных преобладают травяные корма, не менее 26 % приходится на долю силоса, в рационах жвачных животных удельный вес силосованных кормов по питательности достигает 60 %.

Большое внимание в последнее время уделяется сбалансированности кормов по содержанию всех компонентов, и в первую очередь – по содержанию белка. В комплексе мер по обеспечению животноводства растительным белком, по повышению качества травяных кормов важное значение имеет увеличение площади посевов бобовых и бобово-злаковых травосмесей, а также использование высокоэффективных технологий их заготовки и хранения [1, 2].

Потери питательных веществ силосованных кормов в результате нарушений сроков уборки и отклонений от технологий заготовки могут достигать 40 %. Получение качественных силосованных кормов требует соблюдения ряда основных технологических приемов и подходов, среди которых важное значение имеет регулирование микробиологических процессов, в том числе за счет внесения разных добавок (биологических заквасок, химических консервантов, ферментных препаратов и др.). Внесение в силосуемую массу бактериальных препаратов является одним из наиболее эффективных и экологически безопасных способов снижения потерь при силосовании и повышения качества корма путем направленного регулирования процессов ферментации, существенного улучшения витаминного состава, соотношения органических кислот в нем, обеспечения длительного срока хранения и др. [2–4].

Основой бактериальных препаратов для повышения качества силосованных кормов являются активные штаммы микроорганизмов. С этой целью для включения в состав бактериального консорциума нами были отобраны гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии, характеризующиеся активным ростом, способностью конкурировать с другими микроорганизмами, активным кислотообразованием, быстрым подкислением субстратов до pH 4,2 и ниже, кислотоустойчивостью, широким спектром сбраживаемых углеводов, способностью утилизировать гексозы, пентозы, олиго- и полисахариды, в том числе основные запасные полисахариды злаковых и бобовых трав (крахмал, полифруктозиды), отсутствием способности образовывать декстрины из сахарозы или маннита из фруктозы, отсутствием воздействия на органические кислоты, осмолотерантностью, температурными пределами роста до 50 °С.

С чэлю інтэнсіфікацыі млочнакіслага брожэня на самых ранніх стадыях ферментацыі расліннага сырыя намі былі отобраны быстрорастушыя формы млочнакіслых бактэрыяў.

Включэнне ў склад бактэрыяльнага консорцыума штаммаў млочнакіслых і прапіонавокіслых бактэрыяў с высокай антаганістычнаскай актывнасцю па адношэнні к мікраарганізмам рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Clostridium*, *Bacillus* абеспечыт падаўленне развіцця возбудзіцеляў порчы кормаў.

Продукцыя отобранымі культурамі мікраарганізмаў спектра ферментаў (амілаза, α -галактозідаза, β -глюканаза, пектыназа і др.), гідролізуючых трядноусваяемыя оліго-, крахмалсодержачыя і некрахмальныя полісахаріды расліннага сырыя, будзе спосабстваваць уллучэнні біадаступнасці, павышэнні пераварымасці, увелічэнні піщевой і энэргетычнаскай цэннасці палучаемых сіласаваных кормаў.

В рэзультате праведенной работы отобраны шесть актывных штаммаў млочнакіслых і прапіонавокіслых бактэрыяў, перспектывных для включэння ў склад бактэрыяльнага консорцыума – асновы прэпарата для павышэння якасства сіласаваных кормаў із бобово-злаковых трав.

Спісак іспользаваных істочнікаў

1. Нормы кормлення і пшательнасць кормаў для высокапрадуктывных жывотных / Н.А. Шарейко [і др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – 84 с.
2. Станкевич, С.И. Современныя тэхналогія заготовки кормаў / С.И. Станкевич, С.И. Холдеев. – Горки : БГСХА, 2016. – 29 с.
3. Квасніков, Е.И. Млочнокіслыя бактэрыя і пуці іх іспользавання / Е.И. Квасніков, О.А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – 390 с.
4. Lactic acid bacteria – R & D for food, health and livestock purposes / ed.: M. Kongo. – InTech, 2013. – 670 p.

Первичный скрининг микроорганизмов на нематицидную активность в отношении *Meloidogyne* spp.

Нековаль С.Н., Глушков С.М., Чурикова А.К., Чернякович М.Н.

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»,
Краснодар, Россия,
электронный адрес: s.nekoval@yandex.ru

На производство овощей в открытом и защищенном грунтах негативно влияют высокоадаптированные облигатные эндопаразиты корневой системы – галловые нематоды *Meloidogyne* spp., вызывающие заболевание мелойдогиноз [1, 2]. Разработка препаратов против фитопаразитических нематод на основе живых микроорганизмов и их метаболитов является важным направлением в экологизации сельского хозяйства [3].

Восемь штаммов микроорганизмов из коллекции ООО «Биотехагро» были оценены на нематицидную активность против *Meloidogyne* spp. Исследования проводили в лабораторных условиях и в защищенном грунте на растениях томата.

В результате обработки личинок нематод второго возраста жидкой культурой *T. viride* (титр $5,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл) в лабораторных условиях была отмечена 100,0%-ная смертность через 24 ч. Относительно высокая смертность наблюдалась в варианте с применением *Streptomyces avermitilis* БК-3 (титр $3,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) – 64,4 % и *Paecilomyces lilacinus* БК-6 (титр $3,2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) – 62,7 %.

Определение биологической эффективности (БЭ, %) изучаемых микробных агентов на фоне искусственного заражения почвы *Meloidogyne* spp. осуществляли на восприимчивой мутантной линии томата Мо 463. Обработка почвы в вегетационных сосудах привела к уменьшению количества галл на растение.

Результаты изучения нематицидной активности штаммов микроорганизмов из коллекции ООО «Биотехагро» против личинок второго возраста *Meloidogyne* spp., их биологической эффективности в условиях вегетационных вазонов позволили выявить наиболее эффективные штаммы – *Metarhizium anisopliae* БК-2 (титр $7,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл); *Arthrobotrys conoides* БК-8 (титр $6,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл); *Arthrobotrys oligospora* БК-8/1; (титр $5,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл); *Paecilomyces lilacinus* БК-6 (титр $3,2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл); *Trichoderma viride* Г-2 (титр $5,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл); *Bacillus thuringiensis* БК-10 (титр $5,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл); *Streptomyces avermitilis* БК-3 (титр $3,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл), и рекомендовать их в качестве агентов биологического контроля в борьбе с галловыми нематодами.

Список использованных источников

1. Гончаров, А.В. Устойчивость тыквенных культур к мелойдогинузу (галловой нематоде) / А.В. Гончаров, А.А. Шестеперов, С.В. Лычагина // Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та. – 2020. – Т. 83, № 3.
2. *Solanum palinacanthum*: broad-spectrum resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) / G. Murata [et al.] // Pest Management Science. – 2020. – Vol. 76, № 12. – P. 3945–3953.
3. Чурикова, А.К. Биологические агенты и их метаболиты в борьбе с *Meloidogyne* spp. при выращивании овощных культур (обзор) / А.К. Чурикова, С.Н. Нековаль // Юг России: экология, развитие. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 175–186.

Оценка жизнеспособности и ферментативной активности консорциума бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1879 и *B. subtilis* БИМ В-1878 в составе комбикормов при оптимизации условий влаготепловой обработки и гранулирования

Новикова А.С.¹, Проскурнина И.А.¹, Коломиец Э.И.¹, Сверчкова Н.В.¹, Кошак Ж.В.²

¹ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: novikova.alina.s@mail.ru

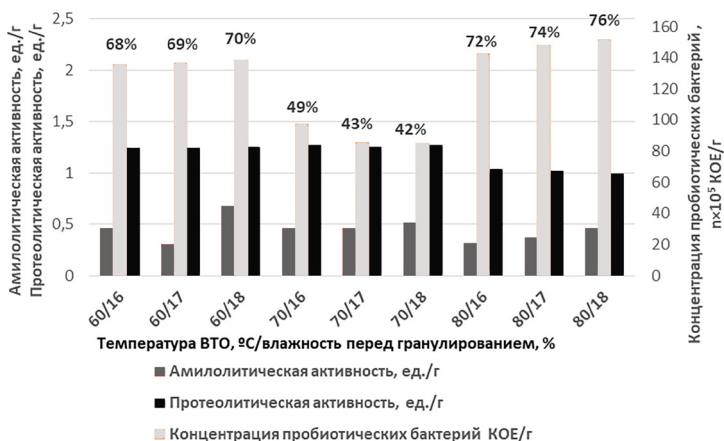
²РУП «Институт рыбного хозяйства», Минск, Беларусь

В связи с возросшими требованиями к эффективности продукции микробного синтеза актуален поиск высокоактивных штаммов-продуцентов, сохраняющих жизнеспособность в широких температурных пределах и способных продуцировать термолабильные биологически активные метаболиты. Такими свойствами обладают бактерии рода *Bacillus*, споровые формы которых устойчивы к действию высоких температур и перепадам давления, что обуславливает высокую сохранность клеток в процессах влаготепловой обработки и производства гранулированных и экструдированных комбикормов [1].

Преимуществами технологии влажного гранулирования комбикормов является низкая крошимость изготовленных гранул (не более 2 %), экономия расхода комбикорма по сравнению с гранулами, полученными сухим способом (18–21 %), доступность технологии для мелких фермерских хозяйств [2, 3].

Для отработки условий получения гранулированной формы комбикорма для сеголетков и двухлетков карпа, обогащенного консорциумом пробиотических бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1879 и *B. subtilis* БИМ В-1878, исследовали влияние различных режимов влаготепловой обработки (ВТО) (кратковременное воздействие температуры в диапазоне 60–80 °С, влажности сырья 16–18 %) на выживаемость бактерий и ферментативную активность получаемого продукта.

Стоит отметить, что биомасса бактериального консорциума в составе комбикорма сохраняет свою жизнеспособность при воздействии испытанных технологических параметров, применяемых при получении гранулированной формы комбикорма, на уровне не менее $5,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г (42–76 %), что является достаточным для обеспечения пробиотического эффекта. При этом наибольшая сохранность консорциума (72–76 %) наблюдается при температуре ВТО 80 °С (см. рисунок).



Влияние режимов ВТО на выживаемость консорциума бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1879 и *B. subtilis* БИМ В-1878 в составе комбикорма и ферментативную активность. Параметр рассчитывался исходя из расчетной концентрации пробиотических клеток в готовом комбикорме ($2,0 \cdot 10^7$ КОЕ/г) с учетом ввода кормовой добавки в корм 0,5 кг/т

Амилолитическая и протеолитическая активность полученных образцов комбикорма при испытанных режимах оставалась в пределах 0,31–0,78 ед/г и 1,02–1,27 ед/г соответственно. Наилучшие показатели гидролитической активности – $0,67 \pm 0,03$ ед/г и $1,26 \pm 0,05$ ед/г соответственно, были получены при параметрах ВТО 60 °С и 18 % влажности.

Для уточнения оптимальных параметров ВТО проведен полнофакторный эксперимент со звездным плечом и двумя независимыми факторами – температурой и влажностью рассыпного комбикорма перед гранулированием. Выходными параметрами служили амилолитическая и протеолитическая активность комбикорма. В результате анализа установлено, что максимальные значения ферментативной активности продукта будут получены при оптимальных значениях влажности смеси перед гранулированием – 17,5–18,5 % и температуре продукта перед пресс-гранулятором – 65–75 °С. При данных параметрах процесса гранулирования ожидаемая амилолитическая активность комбикорма составит в среднем 0,70 ед/г, протеолитическая активность – 0,55 ед/г.

Список использованных источников

1. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О.В. Федорова [и др.] // Вестн. технол. ун-та. – 2016. – № 15 (19). – С. 170–174.
2. Желтое, Ю.А. Организация кормления разновозрастного карпа в фермерских рыбных хозяйствах / Ю.А. Желтое. – Киев : Фирма «ИНКОС», 2006. – 282 с.
3. Вайстих, Г.Я. Гранулирование кормов / Г.Я. Вайстих, П.М. Дарманьян. – М. : Агропромиздат, 1988. – 143 с.

Влияние гербицидов на рост колоний и прорастание конидий гриба *Calophoma complanata* – патогена борщевика Сосновского

Павлова Н.А., Гусенков Е.А., Берестецкий А.О.

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Россия,*

электронный адрес: n.pavlova@vizr.spb.ru

Одним из способов борьбы с сорными растениями является биологический метод с использованием фитопатогенных грибов [1]. Из-за небольшой эффективности в полевых условиях широкого распространения микогербициды не получили [2]. В то же время появление устойчивых к гербицидам популяций сорных растений заставляет сельхозпроизводителей использовать смеси различных химических препаратов [3]. Одним из вариантов решения проблемы низкой эффективности микогербицидов может стать их использование с полными или сублетальными дозами химических гербицидов, подавляющих защитные функции растений [4].

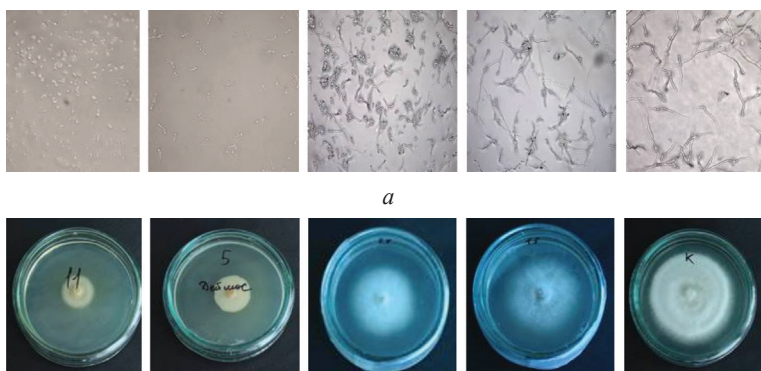
Борются с растениями борщевика в основном механическим способом и применением химических гербицидов [5]. С помощью фитопатогенных грибов можно управлять численностью сорных растений [6]. Определенный микогербицидный потенциал выявлен у гриба *C. complanata* [7]. Целью настоящей работы являлась оценка совместимости гриба *C. complanata* с синтетическими гербицидами, разрешенными для применения на приусадебных участках и парах для их последующего использования в борьбе с борщевиком Сосновского. Задачи исследования заключались в оценке влияния гербицидов на рост колоний и прорастание конидий гриба *C. complanata* в максимально рекомендуемых и пониженных концентрациях.

В представленной экспериментальной работе использованы 4 гербицида, рекомендованные для использования на непахотных землях, с разными действующими веществами: Деймос, ВРК (480 г/л дикамбы) с нормой расхода 3 л/га; Агрокиллер, ВР (500 г/л глифосата кислоты) – 5 л/га, Магнум, ВДГ (600 г/кг метсульфуронметила) – 0,3 кг/га и Лазурит, СП (700 г/кг метрибузина) – 1,4 кг/га. Во всех опытах использовали максимальные рекомендованные и пониженные до 80, 60, 40, 20, 10 % концентрации гербицидов от их максимальной нормы применения.

Следует отметить, что на непахотных землях нормы расхода гербицидов существенно выше (примерно на порядок), чем для защиты сельскохозяйственных культур от сорных растений.

Действие гербицидов на прорастание конидий *C. complanata* оценивали их проращиванием на водном агаре (ВА) с различными концентрациями испытуемых препаратов при температуре 20 °С; учет их всхожести проводили через 18 ч после посева. Для определения средней длины ростовых трубок у проросших конидий в поле зрения измеряли ростовые трубки у не менее 30 конидий.

Влияние гербицидов на рост штамма *C. complanata* изучали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) с различными концентрациями испытуемых препаратов. У края 10-суточной колонии гриба на КСА пробочным сверлом вырезали 8 мм агаровые блоки, которые по одному помещали на питательную среду в центр чашки Петри. Чашки инкубировали в термостате при 24 °С в темноте. Диаметр колоний измеряли на 7 сут.



а
б
Агрокиллер Деймос Лазурит Магнум Контроль

Влияние различных гербицидов на прорастание конидий (а) и рост колоний штамма *C. complanata* (б): а – концентрация гербицидов в 2,5 раза ниже максимальной нормы расхода; б – в 5 раз ниже максимальной нормы расхода

Все исследуемые препараты оказали существенное влияние на прорастание конидий гриба (см. рисунок, а). Гербицид «Агрокиллер» полностью ингибировал прорастание конидий при всех испытанных концентрациях. Наименее чувствительным *C. complanata* был к препарату «Магнум». При использовании максимально рекомендуемой концентрации прорастание конидий составляло 23 %. В 60%-ной концентрации от рекомендуемой дозы «Магнум» всхожесть конидий достигала 90 %.

При использовании 20%-ной концентрации гербицидов «Магнум», «Лазурит» и «Деймос» длина ростовых трубок конидий была сравнима с контролем. Все исследуемые гербициды, за исключением препарата «Агрокиллер», в пониженной в 10 раз концентрации увеличивали длину ростовых трубок конидий. Добавление «Магнума» в данной концентрации в 1,7 раза стимулировало длину ростовых трубок конидий (см. таблицу).

**Средняя длина ростковых трубок конидий (мкм)
при различных концентрациях гербицидов**

Гербицид	Средняя длина ростковых трубок конидий (мкм) при различных концентрациях гербицидов						
	100	80	60	40	20	10	0
Деймос	0	16,3 ± 4,5	17,8 ± 2,4	37,3 ± 5,6	57,4 ± 5,1	79,2 ± 6,2	69,8 ± 4,7
Агрокиллер	0	0	0	0	0	0	69,8 ± 4,7
Магнум	21,4 ± 1,2	29,0 ± 1,1	54,5 ± 1,8	65,1 ± 1,8	75,9 ± 2,4	123,1 ± 3,7	73,0 ± 1,7
Лазурит	0	0	26,6 ± 0,9	51,5 ± 2,5	67,0 ± 1,8	83,8 ± 2,9	73,0 ± 1,7

При использовании максимальной рекомендованной концентрации испытанные гербициды проявили фунгистатический эффект и замедляли рост колоний штамма *S. complanata* на 80–90 % по сравнению с контролем (вода), за исключением «Лазурита», в варианте с которым диаметр колоний на 7 сут составлял около 30 % от контроля (см. рисунок, б). Наименьшая чувствительность штамма *S. complanata* к исследуемым препаратам выявлена в вариантах 10–20 % концентрации от полной нормы расхода гербицидов «Лазурит» и «Магнум». Размер колоний на КГА с Лазуритом составлял 86 % от контроля. При добавлении в среду гербицида «Магнум» диаметр колоний составлял 89 % по сравнению с контролем.

Таким образом, возможно совместное использование мицелия *S. complanata* с пониженными не менее, чем в 3 раза концентрациями гербицидов «Магнум», «ВДГ», «Лазурит», «СП» и «Деймос», «ВРК». Показана наибольшая совместимость гриба с препаратом «Магнум», «ВДГ».

Список использованных источников

1. Гасич, Е.Л. Влияние адывантов на патогенность *Calophoma complanata* для борщевика Сосновского / Е.Л. Гасич, Л.Б. Хлопунова, А.О. Берестецкий // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 241–244.
2. Morin, L. Progress in biological control of weeds with plant pathogens / L. Morin // Annual Review of Phytopathology. – 2020. – Vol. 58. – P. 201–223.
3. Современное состояние проблемы изучения и применения гербицидов (дайджест публикаций за 2014–2017 гг.) / Ю.Я. Спиридонов [и др.] // Агрохимия. – 2019. – № 6. – С. 81–91.
4. Levesque, C.A. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate / C.A. Levesque, J.E. Rahe // Annual Review of Phytopathology. – 1992. – Vol. 30, № 1. – P. 579–602.
5. Гербициды против борщевика Сосновского / Е.А. Якимович [и др.] // Наше сельское хозяйство. – 2018. – С. 56–61.
6. Берестецкий, А.О. Влияние состава питательного субстрата и продолжительности культивирования на продуктивность, биологическую активность и хроматографические профили экстрактов *Stagonospora cirsii* S-47 / А.О. Берестецкий, М.Ю. Белозерова, Д.С. Прокофьева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 1. – С. 76–89.
7. Штамм гриба *Phoma complanata* (Tode) Desm. 1.40 (ВИЗР), обладающий микогербицидной активностью против борщевика Сосновского : пат. RU 2439141 С1 / Е.Л. Гасич, Л.Б. Хлопунова, А.О. Берестецкий, С.В. Сокорнова. – Опубл. 10.01.12.

Бактериофаги фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*: свойства, культивирование, применение

Пилипчук Т.А., Коломиец Э.И.

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: tanya.pilipchuk@tut.by

В настоящее время бактерии *Pseudomonas syringae* являются одними из наиболее вредоносных видов фитопатогенных бактерий, вызывая заболевания большого количества дикорастущих и культурных растений, включая овощные, плодовые, зерновые и многие другие хозяйственно-ценные культуры, а также лесные и городские деревья. Вследствие бактериозов растения увядают и погибают, что приводит к значительному недобору урожая (от 40 до 100 %), снижению товарных и пищевых качеств сельскохозяйственной продукции. Важнейшей задачей аграриев является мониторинг вспышек бактериальных заболеваний и разработка способов борьбы с бактериозами, в том числе с применением микробных препаратов. Использование биологических средств защиты растений на основе бактериофагов в качестве профилактического и терапевтического средства борьбы с бактериозами представляется наиболее целесообразным, поскольку фаги обладают высокой эффективностью и селективным механизмом действия в отношении фитопатогенных бактерий. Препараты на основе бактериофагов в сравнении с химическими средствами безопасны для теплокровных животных, рыб, пчел, не загрязняют окружающую среду. Устойчивость к бактериофагам у фитопатогенных бактерий наблюдается гораздо реже, чем к антибиотикам, а при использовании комплексных препаратов из нескольких штаммов фагов – вообще не отмечена.

В связи с вышеизложенным целью работы была разработана биопестицида «Мультифаг» для защиты растений от бактериозов, вызванных *P. syringae*.

На первом этапе был отобран штамм *P. syringae* БИМ В-268 с выраженной фитопатогенной активностью в качестве индикаторной культуры для выделения бактериофагов. Анализ его полногеномного секвенирования показал, что средняя нуклеотидная идентичность генома исследуемого и типового штаммов (из базы данных NCBI *Pseudomonas syringae* КСТС 12500Т) составила 95,5 %, что подтвердило его таксономический статус как *P. syringae*. В геноме штамма *P. syringae* БИМ В-268 обнаружены гены, кодирующие белки нуклеации образования льда, биосинтеза сиринопептина, системы секреции типа III и VI, что говорит о его фитопатогенности.

Далее были выделены, отобраны и изучены штаммы бактериофагов, обладающие высокой литической активностью в отношении фитопатогенных бактерий *P. syringae* с выходом фаговых частиц не менее $1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл. На основе

6 наиболее активных штаммов создан консорциум *Consortium Pseudomonas phages* БИМ BV-65 Д, который депонирован по форме «Национальное патентное депонирование» в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Отмечена высокая выживаемость бактериофагов, входящих в консорциум, (титр фагов $1-9 \cdot 10^9$ БОЕ/мл) в диапазоне температур 30–60 °С, pH среды 5–9, концентрации хлороформа 1–10 % при экспозиции 1 ч. При изучении единичного цикла роста фагов установлена быстрая воспроизводимость фаговых частиц – адсорбционная способность составляет около 80 % фаговых частиц за 9–15 мин, латентный период фагов проходит за 20–30 мин, период лизиса – за 20–35 мин, урожайность – $80 \pm 1,2-110 \pm 4,2$ БОЕ/кл.

Выявлены генетические различия в геномах фагов консорциума с использованием RAPD-ПЦР и по рестрикционным профилям, полученным с помощью эндонуклеаз *Ava* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Eco* RI. Определены полные нуклеотидные последовательности бактериофагов *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д, *Pseudomonas phage* БИМ BV-46 Д и *Pseudomonas phage* БИМ BV-61 Д (депонированы в ГенБанкNCBI под регистрационными номерами MT094 431, MT094 430, KP025 626 соответственно). В геномах не выявлено генетических детерминант, способных кодировать белки, определяющие лизогенный цикл развития, что позволяет отнести их к вирулентным и подтверждает возможность их использования в качестве средств защиты от бактериальных патогенов.

Установлено, что оптимальными параметрами выращивания бактериофагов являются питательная среда ГРМ-бульон и температура 28 °С. Технология получения биопестицида «Мультифаг» основана на двухчасовом культивировании бактерии-хозяина *P. helmanticensis* БИМ В-582 Д в трех параллельных ферментерах, добавлении бинарных смесей фагов, двухчасовом лизисе бактерии-хозяина и смешивании полученных фаголизатов в соотношении 1:1:1.

Показано, что способ обработки семян препаратом в 2 % концентрации влияет на снижение уровня пораженности их патогенами. Так, опрыскивание семян приводит к снижению уровня пораженности их патогенами через 2 ч на 63,5–69,1 %, а через 24 ч – на 86,9–99,6 %, в то время как при замачивании семян – через 2 ч на 75,0–99,6 %, а через 24 ч наблюдается полное отсутствие патогена (100 %). Двухгодичные испытания препарата в производственных условиях УП «Агрокомбинат Ждановичи» на культуре огурца открытого грунта показали, что трехкратная обработка растений 2%-ной рабочей жидкостью препарата снижает пораженность листового аппарата огурца угловатой бактериальной пятнистостью в среднем на 48–51 % и позволяет дополнительно получить от 12 до 16 % экологически чистой продукции. Биопестицид «Мультифаг» зарегистрирован и включен в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь».

Характеристика штаммов *Bacillus velezensis* с пробиотическими свойствами, выделенных из микробиоценозов природных водоемов

Проскурнина И.А.¹, Юшко Е.Ю.², Летвинова В.С.¹, Лосев О.А.¹

¹ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: irina_pros@tut.by

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

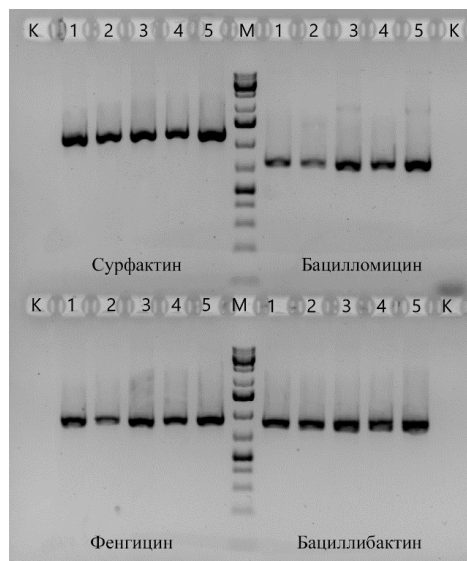
Большинство культур, используемых в настоящее время в пробиотических препаратах, выделены из природных источников. Оценку целесообразности использования природных изолятов в составе биопрепаратов проводят по ряду критериев, таких как непатогенность и нетоксигенность, антимикробная активность, продукция биологически активных веществ (в том числе ферментов), антибиотикорезистентность, кислото- и желчеустойчивость. Антагонизм пробиотических штаммов по отношению к патогенным бактериям может проявляться либо за счет конкурентного исключения, снижения окислительно-восстановительного потенциала, межбактериальной агрегации, либо продукции противомикробных метаболитов, бактериоцинов и биосурфактантов, что позволяет пробиотическим культурам модулировать резидентную кишечную микробиоту в интересах хозяина [1].

Пробиотические бактерии рода *Bacillus*, входящие в состав характерных микробиомов донных отложений и воды рыбоводческих водоемов, а также обнаруживающиеся непосредственно в самом организме рыбы и особенно в кишечнике, используются как основа пробиотических препаратов [2].

Из образцов воды, донных отложений природных водоемов и рыбы были изолированы и отобраны спорообразующие бактерии МС 1, ВС 1, ЛС 1, ЛС 2 с антагонистической активностью в отношении широкого спектра возбудителей заболеваний. Зоны задержки роста возбудителей аэромоназов *A. salmonicida*, *A. rivipollensis*, *A. sobria*, *A. hydrophila* филтратами культуральных жидкостей штаммов-антагонистов составили 15–23 мм, в отношении патогенных тест-культур *Salmonella dublin* – 11,5 ± 0,5 мм, *Staphylococcus aureus* КМИЭВ 108-В – 17,0–23,5 мм, *E. coli* КМИЭВ 39А – 16,0–22 мм.

Изучение морфологии клеток и колоний исследуемых изолятов, их физиолого-биохимических свойств и использование молекулярно-генетических методов (получены продукты полимеразной цепной реакции с использованием видоспецифичных праймеров) [3] позволило сделать предварительное заключение о таксономическом статусе штаммов МС 1, ВС 1, ЛС1, ЛС 2 и отнести их к виду *Bacillus velezensis*.

Использован ПЦР-анализ для подтверждения наличия в геномах исследуемых штаммов локусов, отвечающих за синтез антимикробных метаболитов, в том числе сурфактина, бацилломицина, фенгицина, бациллибактина, что свойственно бактериям вида *B. velezensis* [4] (см. рисунок).



Электрофореграмма продуктов ПЦР генетических детерминант синтеза сурфактина, бацилломицина, фенгицина и бациллибактина: *M* – маркер молекулярного веса DNA Ladder Mix.; *1* – *B. velezensis* ЛС 1; *2* – *B. velezensis* ЛС 2; *3* – *B. velezensis* МС 1; *4* – *B. velezensis* ВС 1

Показана также продукция исследуемыми штаммами гидролитических ферментов – комплекса амилаз (коэффициент гидролиза крахмала – 1,77–2,44), протеаз (2,22–3,33), целлюлаз (1,44–2,0), липаз (1,33–2,0).

Список использованных источников

1. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review / M.J. Zorrichzakra [et al.] // *Veterinary Quarterly*. – 2016. – Vol. 36, № 4. – P. 228–241.
2. Interaction of a novel *Bacillus velezensis* (BvL03) against *Aeromonas hydrophila* *in vitro* and *in vivo* in grass carp / L. Cao [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 103, № 21–22. – P. 8987–8999.
3. Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 Enhanced Plant Growth Associated with Efficient Rhizospheric Colonization Monitored by qPCR with Primers Designed from the Whole Genome Sequence / Y. Zhang [и др.] // *Curr. Microbiol.* – 2018. – Vol. 75, № 12. – P. 1574–1583.
4. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д / А.В. Бережная [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55, № 4.

Метаболомное профилирование антимикробных соединений, секретлируемых видами рода *Bacillus* как основа для направленного использования биопрепаратов в защите растений от болезней

Рогожин Е.А.

Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург – Пушкин, Россия,
электронный адрес: rea21@list.ru

Бактерии рода *Bacillus* представляют собой микроорганизмы, синтезирующие большое разнообразие биологически активных веществ различной химической природы. Одну из наиболее внушительных групп таких соединений формируют метаболиты с антагонистической активностью, которые, с одной стороны, определяют конкурентную способность их продуцентов в условиях микробных биоценозов, с другой – формируют стратегию их выживания при взаимодействии с организмами – представителями более высоких таксономических групп, как правило, почвенными беспозвоночными. Одно из несомненных преимуществ *Bacillus* spp. заключается в способности секретировать большинство таких антимикробных веществ, что делает эти микроорганизмы крайне привлекательными с точки зрения биотехнологии [1–2].

В качестве одного из таких прикладных направлений выступает сельскохозяйственное производство, в котором некоторые виды рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilis*) фигурируют в качестве преобладающих компонентов биопрепаратов – биологических средств защиты культурных растений от грибных болезней [3]. Они являются хорошей альтернативой традиционно применяемым химическим фунгицидам, поскольку позволяет снизить нагрузку действующих веществ на агробиоценоз, что в конечном итоге позитивно отражается на качестве урожая с точки зрения содержания остаточных количеств действующих веществ самих пестицидов. Наиболее изученной группой таких антибиотических соединений являются циклические липопептиды, модифицированные короткие линейные пептиды, поликетиды, а также бактериоцины [4–5]. Последние представляют собой обширный и достаточно гетерогенный класс антимикробных молекул, которые свойственны исключительно прокариотам.

Таким образом, идентификация всей совокупности антимикробных веществ секретома *Bacillus* spp. позволит в дальнейшем осуществить их сравнительный анализ между различными штаммами – неотъемлемыми компонентами биопрепаратов. Соответственно, финальной стадией такой работы

может являться проект стандартизации как новых, так и уже применяемых биопрепаратов на основе видов рода *Bacillus*, что в большей степени позволит унифицировать такое определение, как «биофунгицид».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hysek, J. Biological protection of the main cereals against fungal specific diseases / J. Hysek, M. Vach, M. Javurek // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. – 2005. – Vol. 70, № 3. – P. 169–173.
2. Errington, J. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse / J. Errington, L.T.V. Aart // Microbiology (Reading). – 2020. – Vol. 166, № 5. – P. 425–427.
3. Blake, C. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis* / C. Blake, M.N. Christensen, Á.T. Kovács // Mol. Plant Microbe Interact. – 2021. – Vol. 34, № 1. – P. 15–25.
4. Basi-Chipalu, S. A review on characterization, applications and structure-activity relationships of *Bacillus* species-produced bacteriocins / S. Basi-Chipalu, P. Sthapit, S. Dhital // Drug Discov. Ther. – 2022. – Vol. 16, № 2. – P. 55–62.
5. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group / S. Caulier [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 302.

Получение препарата грибной мурамидазы и его применение при выращивании цыплят-бройлеров

Рожкова А.М.¹, Короткова О.Г.¹, Синельников И.Г.¹, Шашков И.А.¹,
Зоров И.Н.¹, Егоров И.А.², Егорова Т.В.², Сеницын А.П.¹

¹Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия,
электронный адрес: amrojko@mail.ru

²Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт птицеводства», Сергиев Посад, Россия

Одно из направлений современной сельскохозяйственной биотехнологии состоит в разработке т. н. кормовых антибиотиков на основе ферментов. В промышленном птицеводстве и животноводстве кормовые антибиотики традиционно применяются с целью улучшения скорости роста птицы и животных, для профилактики и лечения заболеваний. Однако применение классических антибиотиков сопровождается побочными негативными эффектами: происходит их накопление в органах и тканях, а также растет число возбудителей болезней, приобретающих устойчивость к антибактериальным терапевтическим средствам. Поэтому применение антибиотиков негативно сказывается на потребительских качествах мясной продукции, что делает актуальной проблему поиска их замены. В связи с этим особый интерес и актуальность вызывают ферменты-мурамидазы, обладающие антибактериальной активностью.

В лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ «Биотехнологии» РАН были клонированы гены двух мурамидаз: *aormur* (источник *Aspergillus oryzae*) и *pvmur* (источник *Penicillium verruculosum*) в реципиентном грибе *P. verruculosum* В537. Проведен скрининг трансформантов по критерию наличия дополнительной полосы в белковом профиле анализируемых электрофорезом в денатурирующих условиях с последующим масс-спектрометрическим анализом. Получены ферментные препараты PvMur и AoMur, в которых доля соответствующих мурамидаз составляла 15 и 70 % соответственно.

Показано, что применение комбикормов, обогащенных мурамидазой PvMur в количестве 50 г/т совместно с AoMur в количестве 100 г/т, без применения кормовых антибиотиков позволяет получить высокие зоотехнические показатели при выращивании цыплят-бройлеров и оказывать позитивное влияние на показатели неспецифической резистентности их организма.

Работа выполнена при поддержке КПНИ ФНТПР сельского хозяйства на 2017–2030 годы (№ 122 112 300 051-8).

Перспективность использования бактерий *Bacillus subtilis* К-1-1 в качестве биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенов

Рукавцова Е.Б., Захарченко Н.С.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия,
электронный адрес: ruk@bibch.ru

Повышение продуктивности сельскохозяйственных растений и их устойчивости к различным стрессовым факторам внешней среды является важнейшей задачей современной агробиотехнологии. В современном сельском хозяйстве используются в основном химические средства защиты растений (пестициды), негативно влияющие на окружающую среду и здоровье человека и животных. В природных условиях растения обычно существуют в ассоциации с различными полезными микроорганизмами, оказывающими положительное влияние на рост и развитие растений – PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – бактерии, стимулирующие рост растений) [1, 2]. PGPR стимулируют рост и урожай растений за счет способности к азотфиксации, образования физиологически активных веществ, мобилизации питательных элементов из почвы, способности к деградации и детоксикации чужеродных химических соединений в окружающей среде, а также могут подавлять рост различных патогенов. Нарушение связи растений с микроорганизмами может привести к гибели природных агробиоценозов. К широко распространенным PGPR относятся бактерии рода *Bacillus*, характеризующиеся относительной безопасностью и оптимальными биотехнологическими свойствами, например антагонистической активностью к фитопатогенам за счет продукции различных антимикробных метаболитов [3]. Перспективно изучение новых штаммов бацилл для создания на их основе различных биопрепаратов.

В связи с этим в наших экспериментах были исследованы физиолого-биохимические свойства бактерии *Bacillus subtilis* К-1-1. Ранее нами показано, что эти бактерии содержат пептиды, обладающие антибиотической активностью по отношению к многим фитопатогенным грибам и бактериям [4]. Однако природа этих пептидов до сих пор не изучена. Нами была выделена тотальная ДНК из бактерий *B. subtilis* К-1-1 и с помощью ПЦР показано наличие генов, кодирующих липопептидные антибиотики сурфактин, итурин и фенгицин. Анализ поверхностного натяжения показал наличие сурфактина у *B. subtilis* К-1-1. В дальнейшем планируется охарактеризовать и другие антимикробные метаболиты исследуемых бактерий с помощью современных методов очистки, хроматографии и масс-спектрометрии.

Полученные результаты указывают на перспективность практического применения бактерий *B. subtilis* К-1-1 в виде микробиологических препаратов для стимуляции роста растений и защиты их от микробных и грибных патогенов.

Список использованных источников

1. Lugtenberg, B. Plant-growth-promoting rhizobacteria / B. Lugtenberg, F. Kamilova // Ann. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 63. – P. 541–556.
2. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects / A. Basu [et al.] // Sustainability. – 2021. – Vol. 13. – P. 1140.
3. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group / S. Caulier [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 302.
4. Выделение и характеристика полипептида *Bacillus subtilis* К-1-1 – ингибитора роста фитопатогенных грибов и бактерий / Н.С. Захарченко [и др.] // Биотехнология. – 2007. – № 3. – С. 21–26.

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии ризосферы пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан,
электронный адрес: iesmirnova@mail.ru

Зерновые злаки обеспечивают продовольственную безопасность государств и являются основным продуктом питания в большинстве стран. Пшеница – основной злак в борьбе с голодом и нехваткой продовольствия [1, 2] и выращивается более чем в 70 странах мира [3]. Главными производителями пшеницы являются Китай, Индия, США, Россия и Канада, на которые приходится 55–60 % мирового производства. Планируется, что в 2022 году производство пшеницы в мире составит 760 млн т [4]. Для Казахстана пшеница является главной зерновой культурой. Одним из ограничивающих факторов производства пшеницы является недостаток азота. Для выращивания пшеницы требуется до 20–40 кг/га почвенного азота на каждую тонну произведенного зерна [5]. Поэтому при производстве пшеницы применяют минеральные азотные удобрения, негативно влияющие на окружающую среду [6]. Кроме того, азотные удобрения имеют высокую стоимость. Альтернативным путем улучшения азотного питания растений является повышение биологической фиксации азота в ризосфере культур. Применение ризосферных свободноживущих азотфиксирующих бактерий является потенциально привлекательным и альтернативным источником азота. Цель данного исследования – выделение свободноживущих азотфиксирующих бактерий из ризосферы пшеницы, их изучение, идентификация и отбор наиболее эффективных штаммов.

Из ризосферы яровой пшеницы в летний период года (фаза цветения) в Алматинской области Казахстана собраны образцы почв, выделены свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Выделение бактерий проводили на безазотистой среде Эшби. Азотфиксирующую активность бактерий определяли ацетиленовым методом [7]. Идентификацию азотфиксирующих бактерий проводили с помощью определителя Берджи [8]. В общей сложности было выделено 67 изолятов азотфиксирующих бактерий. Установлена высокая численность этих бактерий в ризосфере пшеницы (10^5 – 10^6 КОЕ/г почв). Для определения таксономического положения изолятов изучили их основные морфологические и биохимические признаки. Показано, что выделенные изоляты относятся к родам *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Rhizobium*. Установлено, что

более 50 % от общего числа свободноживущих азотфиксирующих бактерий составляли три рода: *Agrobacterium*, *Azospirillum* и *Azotobacter*. Наличие этих родов микроорганизмов в почве является индикатором наличия агрономически ценных свойств почв. Проведен скрининг изолятов бактерий по способности к фиксации молекулярного азота. Из 67 изолятов отобрали трех наиболее перспективных, способных к активному росту на безазотистых средах и обладающих высокой фиксацией молекулярного азота атмосферы. При этом прирост биомассы у этих штаммов составлял 2,67–2,75 г/л. По совокупности основных морфологических и биохимических признаков отобранные штаммы были отнесены к роду *Azotobacter*, виду *Azotobacter chroococcum*.

Таким образом, из почв ризосферы пшеницы было выделено 67 свободноживущих азотфиксирующих бактерий. Установлено, что численность этих бактерий в ризосфере пшеницы составляет 10^5 – 10^6 КОЕ/г почв. Показано, что свободноживущие азотфиксирующие бактерии ризосферы пшеницы относятся в основном к родам *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*. Отобрано три штамма, обладающих высокой способностью к фиксации молекулярного азота атмосферы. Эти штаммы предполагается использовать для повышения азотного питания растений пшеницы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP19676350.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Poole, N. Agri-nutrition research: Revisiting the contribution of maize and wheat to human nutrition and health / N. Poole, J. Donovan, O. Erenstein // *Food Policy*. – 2021. – Vol. 100. – P. 101–976.
2. Food security and the dynamics of wheat and maize value chains in Africa and Asia / U. Grote [et al.] // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. – 2021. – Vol. 4. – P. 617–009.
3. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis / P. Giraldo [et al.] // *Agronomy*. – 2019. – Vol. 9, № 7. – P. 352–358.
4. Statistics: global wheat production in world 2021–2022 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.statista.com/statistics/267268/production-of-wheat-worldwide-since-1990>. – Date of access: 25.03.2023.
5. The Use of Fertilizers and Pesticides in Wheat Production in the Main European Countries / V.C. Tudor [et al.] // *Sustainability*. – 2023. – Vol. 15. – P. 3038–3045.
6. Recent advances in control technologies for non-point source pollution with nitrogen and phosphorous from agricultural runoff: current practices and future prospects / Y. Xia [et al.] // *Appl. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 63, № 8. – P. 2020.
7. Das, S. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay / S. Das, T.K. De // *Methods X*. – 2018. – Vol. 5. – P. 909–914.
8. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта. – М., 1997. – 800 с.

Штамм ризобий, перспективный для создания биоудобрения под культуру сои (*Glycine max* (L.) Merr.)

Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан, электронный адрес: iesmirnova@mail.ru

Одной из главных бобовых культур в мире является соя (*Glycine max* (L.) Merr.). Соя – это основной источник белка в странах, где мясо и молочные продукты недоступны, что делает ее уникальным продуктом, и спрос на ее зерно с каждым годом растет [1, 2]. Производство сои занимает четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы и рассматривается в качестве дешевого решения проблемы белкового дефицита [3]. По данным ФАО, в 2018 году производство сои во всем мире составило 334,89 млн т, к 2050 году оно увеличится вдвое [4]. Лидерами производства сои являются Бразилия, США и Аргентина, на которые приходится 81 % мирового производства [5, 6].

Для Казахстана соя является одной из основных белково-масличных культур с широким спектром применения в пищевой, кормовой, технической и медицинской отраслях [7]. Однако урожайность сои в Казахстане по сравнению с другими странами низкая. Решением проблемы повышения урожайности сои является применение биоудобрений на основе клубеньковых бактерий, способных фиксировать азот атмосферы и снабжать им растения. Инокуляция сои клубеньковыми бактериями дает возможность сократить применение минеральных азотных удобрений и существенно повысить ее урожайность [8, 9]. В Казахстане для сои применяют биоудобрения импортного происхождения, отечественных препаратов мало («Ризовит АКС») [10, 11]. Однако использование импортных биоудобрений не всегда эффективно, что объясняется конкуренцией бактерий, входящих в состав препаратов, с местными микроорганизмами и неприспособленностью их к почвенным и климатическим условиям Казахстана [12]. Задачей данного исследования было выделение нового штамма клубеньковых бактерий, способного повышать всхожесть семян, эффективно образовывать клубеньки на корнях сои, стимулировать рост и повышать урожайность сои.

Объектом исследования был штамм бактерий Н7, выделенный из клубеньков на корнях сои (*Glycine max* (L.) Merr.), собранных в Алматинской области Казахстана. Для выделения ризобий использовали питательную среду Мазе, для культивирования – среду Исварана. Изучены основные культурально-морфологические и биохимические свойства изолята Н7. Установлено, что бактерии относятся к роду *Bradyrhizobium*. В лабораторных условиях изучено влияние изолята Н7 на всхожесть, рост и развитие растений сои. Показано, что инокуляция изолятом Н7 повышала всхожесть семян до 98 % (контроль – 52 %), стимулировала рост и развитие растений сои: длина стебля увеличи-

лась в 2,2 раза, корней – в 1,8 раза, а число листьев – в 3,7 раза. Нитрогеназную активность бактерий Н7 определяли ацетиленовым методом. Показано, что штамм Н7 обладал высокой азотфиксирующей активностью и способен образовывать большое количество клубеньков на корнях сои. Проведена идентификация бактерий Н7 молекулярно-генетическим методом Сенгера и установлено, что штамм относится к *Bradyrhizobium japonicum*. Тестирование штамма в полевых условиях на двух сортах сои «Жансая» и «Эврика» показало, что применение штамма повышает всхожесть семян до 90 % (контроль 53–54 %), густоту посевов – на 26–30 %, высоту растений – на 25 % а урожайность культуры – на 9–11 ц/га. Таким образом, применение штамма *Bradyrhizobium japonicum* Н7 для инокуляции семян сои повышает всхожесть семян, стимулирует рост и развитие растений сои и повышает ее урожайность. Штамм можно рекомендовать для создания бактериального удобрения для культуры сои.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP09259080.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wijewardana, C. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress / C. Wijewardana, K.R. Reddy, N. Bellaloui // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 278. – P. 92–100.
2. Pangumaran G. Rhizobacteria from root nodules of an indigenous legume enhance salinity stress tolerance in soybean / G. Pangumaran, T.D. Schwinghamer, D.L. Smith // Frontiers in Sustainable Food Systems. – 2021. – Vol. 4. – P. e 617978.
3. Soybean genetic resources contributing to sustainable protein production / B. Guo [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2022. – Vol. 135, № 11. – P. 4095–4121.
4. FAO 2020. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook. doi: org/10.4060/cb1329en
5. Lysenko, Y. TOP-10 soybean producers in the world in 2019 [Electronic resource] / Y. Lysenko. – Mode of access: <https://latifundist.com/rating/top-10-proizvoditelej-soi-v-mire-v-2019-godu>.
6. Abbott, Ch. Brazil and Argentina grow half of World's soybeans [Electronic resource] / Ch. Abbott. – Mode of access: <https://www.agriculture.com/news/business/brazil-and-argentina-grow-half-of-world-s-soybeans>.
7. Акимбекова, Г.Ю. Приоритетные направления развития АПК Казахстана / Г.Ю. Акимбекова, Г.А. Никитина // Проблемы аграрного рынка. – 2020. – № 4. – С. 13–23.
8. Variability of soybean response to rhizobia inoculant, vermicompost, and a legume-specific fertilizer blend in Siaya County of Kenya / C. Mathenge [et al.] // Soil and Tillage Research. – 2019. – Vol. 194. – P. e 104290.
9. Han, Q. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean / Q. Han, Q. Ma, Y. Chen // Journal of the International Society for Microbial Ecology. – 2020. – Vol. 14. – P. 1915–1928.
10. Бобовые культуры. Рекомендации по применению препаратов BASF для защиты бобовых культур в Казахстане 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.agro.basf.kz/Documents/Brochures-2020/2020.pdf>.
11. Смирнова, И.Э. Бактерии для повышения урожайности сои / И.Э. Смирнова, А.К. Сада-нова // Актуальная биотехнология. – 2021. – Т. 1, № 35. – С. 61–65.
12. Сортовая специфичность эффектов ризобактерий в отношении азотфиксирующего симбиоза и минерального питания сои в условиях агроценоза / Ю.В. Береговая [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 5. – С. 977–993.

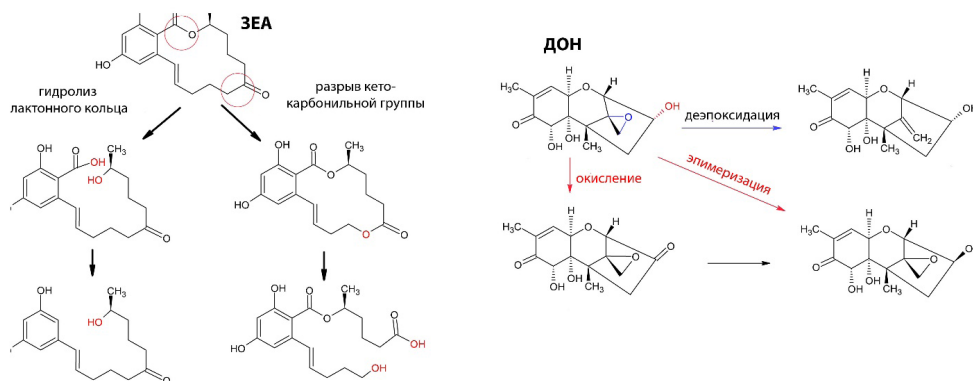
Микробная деконтаминация сельскохозяйственной продукции, загрязненной фузариотоксинами зеараленоном и деоксиниваленолом

Стацюк Н.В., Микитюк О.Д., Назарова Т.А., Щербакова Л.А.

*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
 Большие Вяземы, Россия,
 электронный адрес: nataafg@gmail.com*

Зеараленон (ЗЕА) и деоксиниваленол (ДОН) относятся к наиболее распространенным фузариотоксинам, загрязняющим зерновую продукцию. Деконтаминация загрязненной продукции имеет важное экономическое значение и может быть выполнена различными методами, в т. ч. путем биодеструкции.

К настоящему времени опубликовано множество исследований, связанных с выявлением потенциальных микробных биодеструкторов ЗЕА и ДОН. Однако возможность их практического применения во многом зависит от необратимости реакции трансформации молекул токсина. Для обоих микотоксинов известно несколько путей необратимой биотрансформации, исключаяющей риск образования скрытых микотоксинов и последующего восстановления исходных молекул в желудочно-кишечном тракте (см. рисунок). В то же время авторы многих публикаций, посвященных биодеструкторам микотоксинов, не уточняют пути их трансформации, что усложняет поиск потенциальных доноров ферментов для эффективной детоксификации кормовой и пищевой продукции.



Пути необратимой биотрансформации ЗЕА и ДОН

Проведенный анализ публикаций в данной области исследований позволил суммировать данные о таксонах бактерий и грибов, наиболее перспективных для поиска потенциальных доноров ферментов для необратимой трансформации ЗЕА и ДОН (см. таблицу), а также об их эффективности и условиях применения.

Микроорганизмы, необратимо трансформирующие ЗЕА и ДОН

Микроорганизм	Эффективность трансформации, %	Метод подтверждения необратимой трансформации
Зеараленон (ЗЕА)		
<i>Bacillus</i> (<i>B. natto</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>B. velezensis</i>)	75–100	Отсутствие эстрогеноподобных метаболитов; спектральный анализ метаболитов; выявление в геноме генов, кодирующих ферменты, идентичные ферментам, участвующим в необратимой трансформации
<i>Rhodococcus</i> (<i>R. ruber</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>R. percolatus</i> , <i>R. pyridinivorans</i>)	50–95	Спектральный анализ метаболитов, биотесты на потерю эстрогенности, биотесты на изменение размеров матки
<i>Acinetobacter</i> sp.	~100	Спектральный анализ метаболитов, биотесты на потерю эстрогенности
<i>Pseudomonas</i> sp.	~100	Отсутствие токсичных метаболитов, биотесты на токсичность, подтверждение катаболизма ЗЕА как единственного источника углерода
<i>Clonostachys rosea</i>	68–90	Спектральный анализ метаболитов, биотесты на эстрогенную активность, выделение и идентификация целевого фермента
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	95	Спектральный анализ метаболитов, биотесты на эстрогенную активность
Деоксиниваленол (ДОН)		
<i>Bacillus</i> sp.	100	Спектральный анализ метаболитов, исследование токсичности (кормление поросят)
<i>Eggerthella</i> sp.	100	Спектральный анализ метаболитов
<i>Slackia</i> sp.	>90	Спектральный анализ метаболитов
<i>Coriobacteriaceum</i> sp.	100	Спектральный анализ метаболитов, биотесты на токсичность
<i>Clostridium</i> sp.	>90	Спектральный анализ метаболитов, исследование токсичности (кормление поросят)
<i>Agrobacterium</i> sp.	100	Спектральный анализ метаболитов, оценка иммуносупрессивного эффекта
<i>Devosia</i> (<i>D. mutans</i> , <i>D. insulae</i> , <i>Devosia</i> sp.)	88–99.5	Спектральный анализ метаболитов
<i>Nocardioides</i> sp.	80–100	Спектральный анализ метаболитов
<i>Paradevosia shaoguanensis</i>	100	Спектральный анализ метаболитов
<i>Desulfitobacterium</i> sp.	95–99	Спектральный анализ метаболитов
<i>Pelagibacterium halotolerans</i>	80	Спектральный анализ метаболитов
<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Lysobacter</i> sp.	100	Спектральный анализ метаболитов

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 22-16-00153).

Зависимость устойчивости растений *Solanum lycopersicum* к заражению *Pectobacterium versatile* от уровня экспрессии гена биосинтеза абсцизовой кислоты *NCED3*

Степанова Е.С., Кукреш Г.В., Колубако А.В., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kolubakoav@yandex.by

Pectobacterium versatile – некротрофный патоген растений семейства Пасленовые, вызывающий заболевание «черная ножка» и мягкую гниль клубней (картофеля). Вирулентные свойства этого микроорганизма во многом связаны с эффекторным белком DspE, доставляемым при помощи системы секреции третьего типа непосредственно в клетки растений. В растениях DspE вызывает ряд изменений, приводящих к успешной колонизации растений патогеном.

Основным гормоном стресса является абсцизовая кислота (АБК), регулирующая ответную реакцию на неблагоприятные условия среды, в том числе развитие заболеваний. Однако в литературе содержатся противоречивые данные об участии АБК в обеспечении устойчивости к заболеваниям: эффекты изменений АБК-зависимой сигнализации в разных патосистемах противоположны, а для патосистем с участием *Pectobacterium* spp. информация минимальна.

9-цис-эпоксикаротеноид диоксигеназа *NCED3* – ключевой фермент биосинтеза АБК, по этой причине он является удобной мишенью для изучения влияния гормона стресса на жизнедеятельность растений. Измерение уровней экспрессии этого гена в тканях растений томатов при внедрении *P. versatile* дикого типа показало снижение в 2 раза экспрессии гена *NCED3*, а при заражении *dspE*-мутантом экспрессия гена восстанавливалась до контрольных значений. С целью создания растений со сниженной экспрессией *NCED3* для выяснения его функции в иммунном ответе растений на внедрение патогена в векторе pTRV2 клонирован фрагмент гена 9-цис-эпоксикаротеноид диоксигеназы из растений *Solanum bulbocastanum* размером 698 п. н.

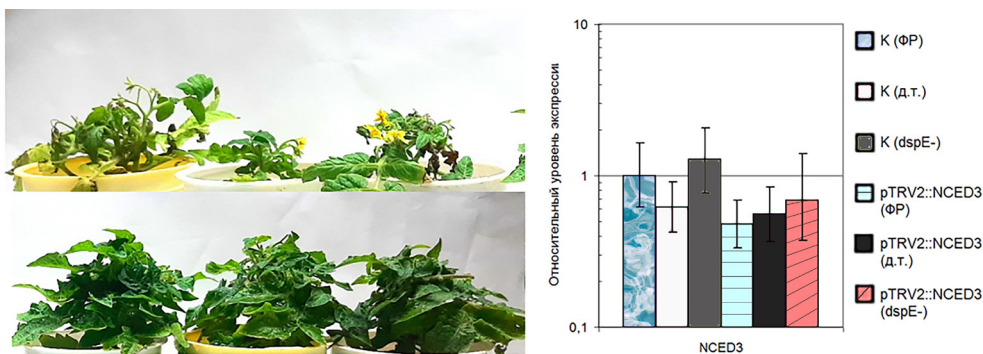
Сравнение клонированного участка последовательности *NCED3* *S. bulbocastanum* и *Solanum tuberosum* показало наличие 14 однонуклеотидных отличий, а с последовательностью *Solanum lycopersicum* – 22 отличия при наличии нескольких протяженных полностью совпадающих участков, что позволяет использовать конструкцию pTRV2:*NCED3* для сайленсинга *NCED3* у всех трех видов рода *Solanum*.

Растения томата *S. lycopersicum* через 92 дня после индукции сайленсинга *NCED3* показали фенотипические отличия от контрольной группы. Используемый в исследовании сорт Micro-Tom является супердетерминантным, растения вырастают довольно низкими (до 10 см), однако высота растений

с сайленсингом гена *NCED3* была еще ниже (примерно 5 см), а площадь кроны меньше. Растения выглядели более слабыми в сравнении с контрольными.

Инфильтрация стеблей томата суспензиями клеток *P. versatile* дикого типа с концентрацией 10^8 кл/мл вызвала через трое суток развитие заболевания у растений с сайленсингом *NCED3*, выразившегося в увядании и последующем некрозе листьев у всех растений, а также в симптомах «черной ножки» на некоторых стеблях, тогда как контрольные растения оказались полностью устойчивы к заражению (см. рисунок).

Измерение уровней экспрессии *NCED3* показало снижение количеств его мРНК в 2 раза в растениях с сайленсингом по сравнению с контрольными растениями, а заражение растений патогеном дикого типа не вносило изменений в экспрессию гена (см. рисунок). При заражении растений *dspE*-мутантом снижения экспрессии *NCED3* не наблюдалось. Возможно, эффекторный белок DspE *P. versatile* вмешивается в иммунную сигнализацию растений томатов, вызывая снижение экспрессии генов биосинтеза АБК, а в растениях с уже сниженной экспрессией *NCED3* такой эффект перестает быть заметен.



Зараженные *P. versatile* растения *S. lycopersicum* с сайленсингом *NCED3* (в верхней части слева) и с нормальным уровнем экспрессии *NCED3* (в нижней части слева). Относительные уровни экспрессии гена *NCED3* в контрольных растениях *S. lycopersicum* и в растениях с сайленсингом гена *NCED3*, инфильтрованных физиологическим раствором, а также суспензиями клеток штаммов *P. versatile* дикого типа и *dspE*-мутантом (справа)

Поскольку снижение экспрессии гена *NCED3* в растениях томатов *S. lycopersicum* приводит к общему ослаблению растений – снижению скорости роста, ослаблению иммунитета, по крайней мере, против некротрофного патогена *P. versatile*, и снижению устойчивости к солевому стрессу, – сверхэкспрессию генов биосинтеза АБК можно рассматривать как один из способов повышения устойчивости к бактериозам.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ Б22М-053.

Кератинолитические свойства нового штамма микромицета *Tolypocladium inflatum*

Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
электронный адрес: timorshina.svetlana@mail.ru

С ростом населения Земли растет потребность человечества в продуктах сельского хозяйства, что неизбежно приводит к увеличению объемов отходов данной отрасли экономики. Так, например, в мире в 2020 году было образовано более 15 млн т лишь куриных перьев, являющихся основным побочным продуктом птицеводства и более чем на 80 % состоящих из кератина [1]. В настоящее время кератинсодержащие отходы утилизируют путем сжигания, химического гидролиза или захоронения. Данные методы увеличивают негативное воздействие на окружающую среду и не позволяют получать аминокислоты и олигопептиды, востребованные в качестве компонентов удобрений, кормовых добавок, а также косметических и медицинских препаратов. Для перехода к рациональному использованию трудноразлагаемых кератинсодержащих отходов необходимо развитие методов биодеградации – переработки побочных продуктов производств за счет деятельности микроорганизмов и их ферментов. Однако кератин устойчив к широкому спектру протеаз, что обусловлено его основными физиологическими функциями: структурной и защитной. В связи с чем целенаправленный поиск и изучение протеаз, способных к эффективному гидролизу отходов животноводства – кератиназ – является актуальным направлением исследований микробиологической энзимобиотехнологии.

Tolypocladium inflatum – известный продуцент внеклеточных ферментов, гидролизующих фибриллярные белки [2, 3]. Авторами работы был выделен новый штамм – *T. inflatum* ST1 из накопительной культуры кератинолитических микроорганизмов. Для выявления способности продуцента секретировать целевые протеазы были получены значения его энзиматических индексов (*EI*) на разных средах. Энзиматические индексы определяли по зонам гидролиза при росте микроскопического гриба на средах, содержащих в качестве основного источника углерода и азота 1,0 % казеина по Хаммерштайну или 0,5 % кератина шерсти. *EI* рассчитывали по формуле:

$$EI = d_2/d_1,$$

где d_1 – диаметр колонии, мм; d_2 – диаметр зоны гидролиза, мм.

Далее проводили двустадийное глубинное культивирование микромицета при перемешивании на орбитальных качалках (200 об/мин) и 28 °С. Сначала

споровую суспензию продуцента использовали в качестве посевного материала для культивирования в среде богатой сахарами, а на 3-и сут культивирования 3 % биомассы по объему переносили в 7 модифицированных сред Чапека, содержащих в качестве источника азота нитрат натрия, перемолотое куриное перо и измельченную свиную щетину, а также их комбинации. Кератинолитическую и казеинолитическую активность измеряли на 3-и и 7-е сут культивирования спектрофотометрически. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции (рН 8,2, 37 °С, 600 об/мин). Затем при культивировании микромицета на среде с наибольшим уровнем накопления кератинолитической активности получали ферментный препарат за счет высаливания внеклеточных белков сульфатом аммония. Белки ферментного препарата разделяли методом колоночного изоэлектрофокусирования в градиенте концентрации сахарозы и рН амфолинов.

Штамм *T. inflatum* ST1 показал умеренно высокое значение *EI* на среде с кератином – 1,10, однако ранее не было сообщений о способности представителей этого рода гидролизовать кератин. Именно поэтому на следующем этапе исследования было проведено культивирование изучаемого микромицета в глубинных условиях. Наибольший уровень протеолитической активности наблюдали на 3-и сут культивирования на среде с перемолотым пером и измельченной щетиной: кератинолитическая активность составляла 87,1 Е, а казеинолитическая активность – 167,1 Е. Обе активности уменьшались незначительно к 7-м сут культивирования. Кератинолитическая активность ферментного препарата *T. inflatum* ST1 (1 мг/мл) была равна 82,1 Е. Фракционирование полученного препарата показало наличие одной кератиназы с *pI* около 5,6 и молекулярной массой около 31 кДа.

Таким образом, новый кератинолитический штамм *T. inflatum* ST1 является перспективным продуцентом биотехнологически значимых протеаз.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 22-24-00674). Вклад авторов: получение и обработка результатов – С.Н. Тиморшина; концептуализация работы и общее руководство – А.А. Осмоловский.

Список использованных источников

1. Preparation and Characterisation of Waste Poultry Feathers Composite Fibreboards / R. Safaric [et al.] // *Materials* (Basel, Switzerland). – 2020. – Vol. 13, № 21. – P. 4964.
2. Исследование тромболитического потенциала экзопроотеиназ, образуемых микромицетом *Tolyposcladium inflatum* 62a, выделенным из грунтов Белого моря / Н.С. Фокичев // *Микология и фитопатология*. – 2023. – Т. 57, № 2. – С. 95–103.
3. Тромболитический потенциал и свойства протеиназ – активаторов плазминогена, образуемых микромицетом *Tolyposcladium inflatum* k1 / Н.С. Фокичев // *Микология и фитопатология*. – 2021. – Т. 55, № 6. – С. 446–452.

Применение пыли системы газоочистки металлургического производства для стимуляции прямого межвидового переноса электронов при анаэробном разложении летучих жирных кислот

Шехурдина С.В.^{1,2}, Литти Ю.В.¹

¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Лаборатория микробиологии антропогенных мест обитания, Москва, Россия,
электронный адрес: sh.sweeta@yandex.ru

²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Пыль систем газоочистки представляет собой металлургический отход, образующийся в больших количествах в результате очистки отходящих газов при механической обработке черных металлов. Преобладающими компонентами пыли являются различные оксиды металлов, например, оксиды железа, что позволяет использовать пыль в качестве электропроводящего материала для стимуляции процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET) [1]. Активация DIET является действенным инструментом для улучшения процесса анаэробного сбраживания (АС) органических отходов, в частности за счет ускорения разложения летучих жирных кислот (ЛЖК). Чрезмерное накопление ЛЖК приводит к закислению и негативно сказывается на метаногенной активности архей, что приводит к снижению степени разложения органического вещества и уменьшению выхода метана [2]. Электропроводящие наноразмерные соединения железа оказывают положительное влияние на АС и выход метана за счет высокой удельной поверхности, растворимости, каталитической природы и электромагнитных свойств [3].

Целью данной работы являлось изучение влияния разных дозировок пыли газоочистки на анаэробное сбраживание смеси ЛЖК (ацетата, бутирата и пропионата) в концентрации 7 г/л с применением двух типов инокулятов. В качестве инокулятов применялись био пленки, выросшие на электропроводящей и диэлектрической поверхностях внутри действующего метантенка. Инкубирование проводилось в термофильном режиме (55 °С) в течение 32 суток.

Лучшие результаты по выходу метана из ЛЖК были показаны для электроактивного инокулята (СW) по сравнению с диэлектрическим инокулятом (РТ). Были отмечены разные оптимальные концентрации пыли для анаэробного сбраживания ЛЖК в зависимости от типа инокулята. Для инокулята СW оптимальная концентрация пыли составила 25 мг/л (СW25), а для РТ – 50 мг/л (РТ50). Потенциальный выход метана для СW25 составил 244,9 мл CH_4 , что на 30 % было больше контроля (188,8 мл CH_4). Для РТ50 потенциаль-

ный выход метана составил 229,8 мл CH_4 , что на 34 % больше по сравнению с контролем (171,6 мл CH_4). Скорость разложения ЛЖК также различалась для двух инокулятов. Для СW25 на 27-е сут культивирования происходило полное разложение ацетата, бутирата и пропионата, а для инокулята РТ – на 32 сут.

Основу архейного сообщества составил метаногенный род *Methanothermobacter* для обоих инокулятов. Доминирующими бактериальными представителями были предположительно синтрофные рода *Coprothermobacter*, *Syntrophaceticus*, *Pelotomaculum* и группы *Limnochordia MBA03*, *Candidatus Caldatribacterium*, *Clostridium sensu stricto 1*, *DTU014* и *Clostridia D8A-2* [2, 4, 5]. Основные доминирующие представители наблюдались в большем количестве в инокуляте РТ по сравнению с инокулятом СW.

Согласно анализу совокупности кинетических, биотехнологических и микробиологических параметров, пыль газоочистки в концентрации 25 и 50 мг/л улучшает характеристики АС, что в дальнейшем позволит применять отход металлургического производства в биотехнологической переработке стоков, богатых летучими жирными кислотами, уменьшая вторичное загрязнение окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список использованных источников

1. Enhanced anaerobic digestion of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) by blast furnace dust (BFD): Feasibility and mechanism / G. Yang [et al.] // Int. J. Hydrog. Energy. – 2019. – Vol. 44, № 33. – P. 17709–17719.
2. Effects of various materials used to promote the direct interspecies electron transfer on anaerobic digestion of low-concentration swine manure / E.A. Zhuravleva [et al.] // Sci. Total Environ. – 2022. – Vol. 839. – P. 156073.
3. Review of impact of nanoparticle additives on anaerobic digestion and methane generation / C.M. Ajay [et al.] // Fuel. – 2020. – Vol. 277. – P. 118–234.
4. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition / J. Lee [et al.] // J. Environ. Manage. – 2019. – Vol. 241. – P. 418–426.
5. Dykma, S. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste / S. Dykma, L. Jansen, C. Gallert // Microbiome. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 105.

Технология производства и преимущества препарата микробного «Биопродуктин» в сухой товарной форме

Шмыга Е.Ю., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.

*ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: kozich.katyusha@mail.ru*

Оптимальным способом получения биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* признано глубинное жидкофазное культивирование, что обусловлено его технологичностью и экономическими преимуществами в производственных условиях, а также популярностью жидких товарных форм препаратов [1]. Альтернативой жидким формам являются микробные препараты в сухой форме. Сухие биопрепараты (порошок, смачивающийся порошок, таблетки) обладают большим сроком хранения в широком диапазоне температур и удобны при транспортировке [2–3].

С целью получения сухой препаративной формы препарата микробного «Биопродуктин», предназначенного для повышения биологической активности почвы, улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения урожайности зерновых культур, проведены исследования по оптимизации параметров концентрирования препарата, подбору носителя и условий для высушивания.

В результате проведенных исследований установлено, что концентрирование препарата в 10 раз при температуре 40–45 °С позволяет сохранить антимикробную и ферментативные активности. При этом показатели фосфатмобилизующей активности повышаются на 40,6 %. Концентрирование препарата при температурах 50 и 55 °С приводит к снижению фосфатмобилизующей активности на 30–40 %, целлюлолитической – на 23,7–29,1 %, ксиланазной – на 21,2–33,9 % и амилолитической – на 35,4–38,5 %.

Для получения сухой формы препарата в качестве носителей использовали ковелос, диаммонийфосфат (ДАФ) и мел в различных концентрациях. Применение ковелоса совместно с ДАФ позволило сохранить качественные характеристики препарата и получить сыпучую препаративную форму. Использование в качестве носителя мела привело к снижению антимикробной активности на 9,2–13,4 %, фосфатмобилизующей – на 12,5–41,2 %, целлюлолитической – на 42,9–68,4, ксиланазной – на 2,1–21,6 и амилолитической – на 33,3–65,1 %.

Сухая препаративная форма препарата микробного «Биопродуктин» по сравнению с жидкой имеет более длительный срок хранения (до 2 лет) в диапазоне температур 0–30 °С и удобна при транспортировке.

Список использованных источников

1. Монастырский, О.А. Современные проблемы и решения создания биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей болезней / О.А. Монастырский, Т.В. Першакова // *Агро XXI*. – 2009. – № 7–9. – С. 3–5.
2. Новикова, И.И. Эффективность препаративных форм на основе микробов-антагонистов в системах защиты растений от болезней / И.И. Новикова // *Материалы 3-го Всерос. съезда по защите растений*. – СПб. : 2013. – Т. 2. – С. 378–384.
3. Васильева, Н.С. Разработка сухих препаративных форм микробиологических препаратов Ленойл, Елена, Азолен : дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / Н.С. Васильева. – Щёлково, 2005. – 131 с.

Поиск мишеней для пектобактериального эффекторного белка DspE в растениях семейства *Solanaceae*

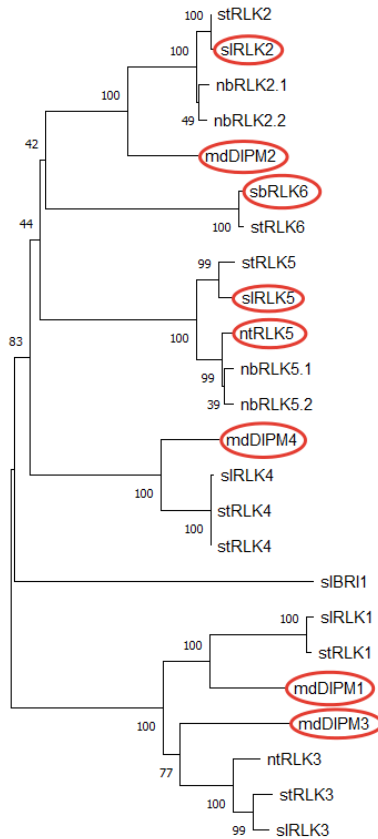
Шруб Е.В., Колубако А.Н., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: shrubkaterina@gmail.com

Бактерии рода *Pectobacterium* вызывают заболевание «черная ножка» стеблей и мягкие гнили различных органов у растений семейства *Solanaceae*, что пагубно сказывается на урожайности важных сельскохозяйственных культур, в особенности картофеля. На сегодня нет полной картины, описывающей все процессы, происходящие в патосистемах с участием *Pectobacterium* spp., однако известен основной эффекторный белок DspE, доставляемый бактериями *P. versatile* в клетки растений-хозяев [1]. Для его гомолога DspA/E из *E. amylovora* ранее было показано специфическое взаимодействие с внутриклеточными доменами 4 рецепторподобных киназ *Malus x domestica* (DIPM1-4) [2]. DIPM – рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK) и относятся к третьему подсемейству этого класса. При нокауте гена яблони *mdDIPM4* удалось получить растения, у которых развитие некроза после заражения снизилось на 50 % по сравнению с контролем [2]. Можно предположить, что исследование гомологичных рецепторподобных киназ может стать ключом к созданию растений, устойчивых к бактериозам.

Ранее в нашей лаборатории обнаружены и охарактеризованы две рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5, взаимодействующие с эффектором DspE *P. versatile*. На их примере показано, что при связывании DspE с их киназными доменами происходит усиление реакции гиперчувствительности в месте контакта с патогеном и подавление жасмонатного сигнального пути [3]. В настоящей работе вырожденные праймеры на основе последовательности киназного домена *mdDIPM4* и его гомологов использовали для амплификации с последующим клонированием генов RLK растений двух видов картофеля – *S. tuberosum* и *S. bulbocastanum*. С помощью дрожжевой двухгибридной системы выявлено взаимодействие с DspE продукта гена, клонированного из *S. bulbocastanum*, но не из *S. tuberosum*. Генетический анализ показал, что клонированный ген *S. bulbocastanum*, в отличие от такового *S. tuberosum*, не является ортологом *mdDIPM4* (см. рисунок). Выявленная таким образом новая DspE-взаимодействующая рецепторподобная киназа из растений дикого вида картофеля получила обозначение sbRLK6.

Дальнейшая работа будет направлена на описание и характеристику sbRLK6. Планируется провести вирус-индуцированный сайленсинг гена этой киназы в растениях картофеля и других растениях семейства *Solanaceae* и исследовать их реакцию на заражение *P. versatile*.



Кладограмма LRR-RLK III. Овалами выделены рецепторы, для которых экспериментально доказано взаимодействие с DspE. Значения бутстрепса указаны у основания ветвей. Двухбуквенные индексы в названиях RLK обозначают *S. bulbocastanum* (sb), *S. tuberosum* (st), *S. lycopersicum* (sl), *Nicotiana tabacum* (nt), *Nicotiana benthamiana* (nb) и *Malus x domestica* (md)

Список использованных источников

1. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности / Е.А. Николайчик [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 81–85.
2. Apple Proteins that Interact with DspA/E, a Pathogenicity Effector of *Erwinia amylovora*, the Fire Blight Pathogen / X. Meng [et al.] // MPMI. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 53–61.
3. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system / V. Pompili [et al.] // Plant Biotechnology Journal. – 2020. – Vol. 18, № 3. – P. 845–858.
4. Бадалян, О.А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2014. – Т. 4. – С. 75–80.

Влияние инвертных углеводных подкормок, полученных с использованием ферментной добавки «Апифил», на наполняемость ректума рабочих пчел в период зимовки

Щепеткова А.Г.¹, Лойко И.М.¹, Скудная Т.М.¹, Сапунова Л.И.², Тамкович И.О.²

¹УО «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь, электронный адрес: fwtmgigien@ggau.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Важнейшую роль в практическом пчеловодстве играет благополучная зимовка пчелиных семей, зависящая от высококачественного состава и достаточного количества углеводного питания и определяющая их медопродуктивность в новом сезоне [1–4].

Известно, что использование в период зимовки углеводной подкормки, изготовленной путем ферментативной инверсии сахарозы, способствует улучшению физического состояния пчел осенне-зимних генераций, а также более полной переработке корма и его усвояемости, что, как следствие, в различной степени влияет на наполняемость ректума [5]. Отмечено также положительное влияние тестообразных ферментированных сахарных подкормок (канди) на показатели наполняемости задней кишки пчел в период зимнего покоя [6].

В Институте микробиологии НАН Беларуси разработана отечественная опытно-промышленная технология получения ферментной кормовой добавки «Апифил», получена ее опытная партия, использованная для приготовления инвертного сахарного сиропа для испытаний в качестве подкормки на пчелах в осенне-зимний период.

Цель исследования – оценка каловой нагрузки на заднюю кишку медоносных пчел, зимующих с запасами углеводных подкормок различного состава.

Для испытаний из 30 семей пчел серой горной кавказской породы были сформированы 3 группы (одна контрольная и две опытные, по 10 пчелосемей в каждой). Пчелиные семьи контрольной группы снабжали 65%-ным сахарным сиропом, пчелосемьям первой опытной группы задавали инвертный сахарный сироп, приготовленный с использованием добавки кормовой ферментной «Апифил», второй опытной группы – углеводную подкормку канди на основе инвертного сиропа.

Для опыта по принципу пар-аналогов подбирали пчелосемьи силой 6–7 улочек с 3 рамками печатного расплода, которые снабжали 5 кг медо-перговых соторамок. Все матки в пчелосемьях в возрасте 1 года с одинаковыми репродуктивными качествами (по наблюдениям в предыдущем сезоне). Все пчелиные семьи содержали в типовых 16-рамочных ульях (рамки размером

435 × 300 мм). В период подготовки пчелиных семей к зимовке (с 03.10.2022) подкормки задавали в кормушки по 400–500 мл сиропа и 0,4–0,5 кг канди, в зависимости от силы пчелосемьи в течение 4–6 недель.

Зимостойкость пчелосемей оценивали по каловой нагрузке на кишечник пчел [7].

Анализ экспериментальных данных показал, что введение в осенний период в рацион пчел инвертных углеводных подкормок, изготовленных с использованием ферментной кормовой добавки «Апифил», способствовало снижению каловой нагрузки на их кишечник. Так, в пчелосемьях опытных групп, получавших инвертные углеводные корма, каловая нагрузка на ректум пчел на 11.02.2023 составляла в среднем 34,00–36,00 мг и была на 28,4–24,2 % меньше, чем у насекомых контрольной группы. Следует отметить, что к началу февраля у пчел контрольной группы, потреблявших 60%-ный сахарный сироп, масса кишечника приблизилась к верхнему пределу нормы и составила 47,5 мг. Минимальные темпы наполнения ректума выявлены у пчел с инвертным сахарным сиропом в рационе. В этом случае каловая нагрузка на заднюю кишку у рабочих особей была на 13,5 мг меньше, чем у насекомых в контрольной группе.

Тенденция сохранилась и к концу зимовки: на 16.03.2023 наполнение ректума рабочих пчел опытных групп составляло в среднем 39,60–42,75 мг, что на 18,6–24,1 % меньше контрольного показателя, достигающего 52,59 мг.

Таким образом, для обеспечения качественной зимовки пчелиных семей более эффективной, чем сахарный сироп, заменой кормового меда являются инвертные углеводные корма, полученные с использованием ферментной кормовой добавкой «Апифил».

Список использованных источников

1. Билаш, Н.Г. Заменители корма пчел / Н.Г. Билаш, Б. Беневоленская // Пчеловодство. – 2002. – № 2. – С. 10–12.
2. Билаш, Н.Г. Искусственные корма / Н.Г. Билаш // Пчеловодство. – 2005. – № 8. – С. 12–14.
3. Показатели зимовки рабочих пчел на фоне использования пробиотических препаратов / И.М. Лойко [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. – Гродно : ГГАУ, 2018. – Т. 40: Ветеринария. – С. 115–121.
4. Маннапов, А.Г. Использование микробиологических препаратов в пчеловодстве / А.Г. Маннапов, Г.С. Мишуковская, О.С. Ларионова // Пчеловодство. – 2009. – № 10. – С. 14–15.
5. Влияние препарата ПЧЕЛИТ на состояние организма медоносных пчел в зимний период / А.Г. Маннапов [и др.] // Гавриш. – 2005. – № 3. – С. 28–31.
6. Комлацкий, В.И. Результаты уровня каловой нагрузки на ректум пчел при использовании подкормки канди / В.И. Комлацкий, О.В. Стрельбицкая, В.И. Кравченко // Ветеринария Кубани. – 2021. – № 5. – С. 39–40.
7. Методические указания к постановке экспериментов в пчеловодстве. – М. : Россельхозакадемия, НИИП, 2005. – 10 с.

Получение и оценка деконтаминационного потенциала рекомбинантных микробных ферментов, детоксицирующих афлатоксин и зеараленон

Щербакова Л.А.¹, Рожкова А.М.², Синельников И.Г.², Микитюк О.Д.¹, Назарова Т.А.¹

¹Всероссийский НИИ фитопатологии, Московская обл., Большие Вязёмы, Россия, электронный адрес: larisavniif@yahoo.com

²ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

Афлатоксин В1 (АФВ1), продуцируемый несколькими видами аспергилловых грибов, и фузариотоксин зеараленон (ЗЕН) относятся к часто встречающимся и крайне опасными для людей и животных загрязнителями кормов и другой сельскохозяйственной продукции [1, 2]. В связи с широким распространением в природе токсигенных видов *Aspergillus* и *Fusarium* и их способностью развиваться на разнообразных органических субстратах, меры борьбы с этими грибами не обеспечивают надежную профилактику микотоксинового загрязнения агропродукции. Физические и химические методы нейтрализации содержащихся в ней АФВ1 и ЗЕН либо имеют целый ряд серьезных ограничений из-за негативного воздействия на обрабатываемые продукты, либо затратны и не всегда эффективны [1]. Преодолению этих ограничений может способствовать разработка методов биологической деконтаминации, основанной на способности некоторых микроорганизмов синтезировать ферменты, трансформирующие микотоксины до нетоксичных или менее токсичных соединений [3, 4]. Технологии микробного синтеза рекомбинантных белков с помощью гетерологичной экспрессии открывают возможности получения доступных, легко культивируемых и высокопроизводительных продуцентов таких ферментов, а деконтаминационные препараты для сельского хозяйства на их основе могут быть созданы без дорогостоящей многоступенчатой очистки целевого продукта.

Данный подход был использован нами для получения рекомбинантных ADTZ – оксидазы АФВ1 в клетках дрожжей *Pichia pastoris* и ЗЕН-специфичной лактонгидролазы (ZHD) в клетках микромицета *Penicillium canescens*. Синтетический ген *adtz* фермента ADTZ был интегрирован в геном *P. pastoris* под контролем промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. В этом случае при трансформации клеток реципиентного штамма GS115 использовали содержащую *adtz* плазмиду pPIG-ADTZ, полученную на основе вектора pPIG-1. Ген, кодирующий ZHD (*zhd101s*), был клонирован в модифицированный линейный челночный вектор PC1 и интродуцирован в геном высокопродуктивного ауксотрофного штамм *P. canescens* PCA-10 под контролем индуцибельного

ксилазазного промотора (*xyIF*). Экспрессионную плазмиду pXEG-ZHD вводили в протопласты этого штамма совместно с плазмидой pSTA10 [5]. После подтверждения с помощью ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования по Сенгеру вставки *adtz* и *zhd101* в трансформированные штаммы GS115 и PCA-10 и последующей идентификации в ADTZ и ZHD в их секрете с помощью ДСН-ПААГ ЭФ и MALDI-TOF МС были отобраны наиболее продуктивные клоны трансформантов.

Тестирование ферментных препаратов, полученных при культивировании этих клонов, показало, что секретируемые ими рекомбинантные ADTZ и ZHD способны трансформировать, соответственно, АФВ1 и ЗЕН в модельных растворах или зерне злаковых. Рекомбинантные ферменты сохраняли свою целевую активность в достаточно широком диапазоне температур (от 10 до 50 °С – ADTZ и от 10 до 40 °С – ZHD) и значений pH (от 5,5 до 9,0 – ADTZ и от 6,5 до 9,5 – ZHD). Инкубация токсинов в растворах лиофилизированных ферментных препаратов при оптимальных для ADTZ (pH 6,0–7,5; 30 °С) и ZHD (pH 8,0; 30 °С) условиях в течение 72 ч приводила к удалению из них 86 % АФВ1 и 100 % ЗЕН соответственно. С помощью ВЭЖХ-анализа экстрактов зерна пшеницы, искусственно загрязненного этими микотоксинами, было установлено, что через 3,5 сут после обработки препаратом ADTZ содержание АФВ1 в образцах не превышало допустимых норм, установленных правилами безопасности для фуражного зерна, а обработка зерна препаратом ZHD приводила к его полной очистке от ЗЕН. Эти результаты свидетельствуют о достаточно высоком детоксицирующем потенциале полученных нами рекомбинантных ADTZ и ZHD и целесообразности дальнейших исследований по разработке на их основе средств деконтаминации агропродукции.

Поддержано Российским научным фондом (проект РНФ № 22-16-00153).

Список использованных источников

1. Афлатоксины: ингибирование биосинтеза, профилактика загрязнения и деконтаминация агропродукции / В.Г. Джавахия [и др.]. – М. : ООО «Редакция журнала “Достижения науки и техники АПК”», 2017. – 159 с.
2. Maragos, С.М. Zearalenone occurrence and human exposure / С.М. Maragos // World Mycotoxin J. – 2010. – Vol. 3. – P. 369–383.
3. Detoxification approaches of mycotoxins: by microorganisms, biofilms and enzymes / S. Nahle [et al.] // Int. J. Food Contam. – 2022. – Vol. 9, № 3. – P. 1–14.
4. Lyagin, I. Enzymes for detoxification of various vycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action / I. Lyagin, E. Efremenko // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 13. – P. 2362-1–2362-2.
5. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene / A. Aleksenko [et al.] // Curr. Genet. – 1995. – Vol. 28. – P. 474–478.

Секция 4

Биотехнологии для медицины и промышленности

Analysis of the relation between the structure and antimicrobial activity of guanidin-containing pectin derivatives

Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turaev A.S.

*Institute of Bioorganic Chemistry of the Uzbek Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan,
e-mail: ibchem@uzsci.net*

Despite the high effectiveness of antibiotics in the treatment of many infectious diseases, the scope of their use is gradually limited due to various side effects on the organism. In addition to this, one of the main problems of modern antibacterial therapy has become the annually growing resistance of pathogenic microorganisms to the antibiotics used. The presence of side effects in antibiotics, the emergence and spread of antibiotic resistance among pathogens of infectious diseases stimulates the development of new antimicrobial agents. In this aspect of research, a significant role is assigned to the synthesis of polymeric derivatives of guanidine. This is because guanidine, after transformation from a low molecular weight to a polymeric state, imparts a positive charge to the entire macromolecule and ensures interaction with the negatively charged surface of microbial cells.

In order to create a new class of polyguanidine compounds, we carried out chemical immobilization of guanidine to pectin macromolecules by covalent and ionic bonds. The chemical addition of guanidine through covalent bonds occurred through the aldehyde groups of oxidized pectin. Sodium pectate was used to bind guanidine to the polysaccharide matrix through ionic bonds. Peculiarities of the chosen synthesis approaches is that by choosing a polysaccharide chain of different structure and varying the reaction conditions, it is possible to obtain reaction products that differ in physicochemical, structural characteristics and the type of chemical bond between guanidine and the polymer matrix.

Microbiological studies under *in vitro* conditions have established that samples in which guanidine was bound to the pectin macromolecule by covalent bonds have a pronounced activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* at a concentration of 10–20 mg/ml. At the same time, the zone of inhibition of the growth of pathogenic microorganisms became larger with an increase in the quantitative content of guanidine groups. We explain this regularity by an increase in the positive charge of the macromolecular chain. While complex compounds based on guanidine and sodium pectate did not show a high level of antimicrobial activity. Along with this, an increase in the concentration of the studied complexes from 10 to 50 mg/ml had almost no effect on the level of antimicrobial activity.

Telomerase-Driven Telomeric DNA Modification and Immune Activation as Potential Broad-Spectrum Cancer Treatment Platform

Gryaznov S.¹, Mender I.¹, Dikmen Z.G.², Yilmaz M.²,
Birichevskaya L.³, Zinchenko A.³

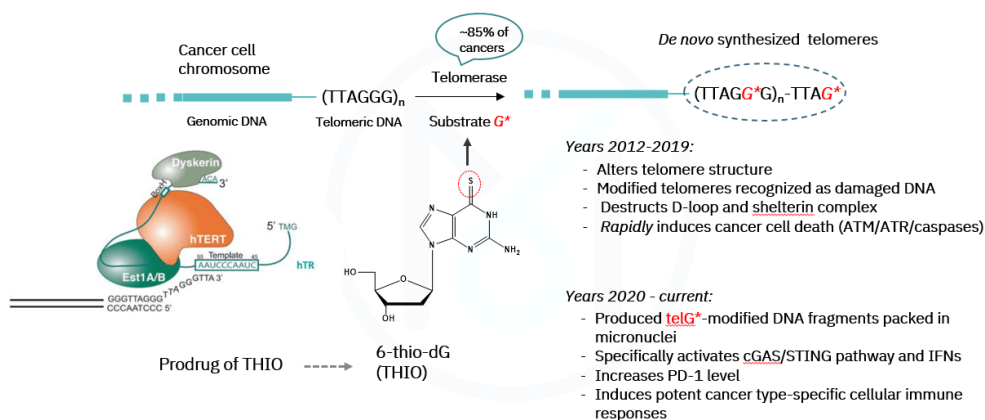
¹Maia Biotechnology, Inc., Chicago, IL 60606, USA,
e-mail: sgryaznov@maiabiotech.com

²Hacettepe University Medical Faculty, Ankara, Türkiye

³Institute of Microbiology NAS, Minsk, Belarus

Telomeres and telomerase in cancer cells are highly attractive targets for specific anti-tumor therapy, since telomerase is almost universally expressed in cancer cells, but not in most normal counterparts.

In this presentation we summarize an unexpected, yet promising, functional property of a modified nucleoside – 6-thio-2'-deoxyguanosine (6-thio-dG; THIO), and lipid-conjugated prodrugs of this pharmacophore, as a potential anticancer agent with a unique mechanism of action. *In vitro* and *in vivo*, THIO is readily converted into the corresponding 5'-triphosphate, which is a substrate for mammalian telomerase. Incorporation of this compound, by telomerase, into *de novo* synthesized cancer cell telomeres leads to a fast induction of DNA damage responses and massive apoptosis. Importantly, the cancer cell death occurs in the telomere length-independent manner [1, 2]. Moreover, THIO treatment leads to generation chromosomal bridges and, eventually, to the formation of cytosolic micronuclei structures, containing cGAS/IFN-I pathway neo-adjuvants – the *de novo* modified telomeric DNA fragments (sh. figure).



Mechanism of anticancer action for 6-thio-2'-deoxyguanosine (THIO)

In addition to activation of innate immunity (*i.e.*, cGAS pathway and NK cells), these *in situ* produced neo-adjuvants are exported extracellularly and then sensed by host dendritic cells, resulting in an enhanced cross-priming and tumor-specific T- cell (both CD4+ and CD8+) activation [3, 4].

Importantly, treatment with 6-thio-dG overcomes resistance to checkpoint blockade (by anti-PD-1 or anti-PD-L1 agents) in advanced *in vivo* cancer models, leading to profound anticancer effects, and to potent induction of tumor type specific long-term anticancer memory in mice. Thus, *in vivo* cancer curative activity was observed in murine syngeneic models of colorectal (MC-38) and lung (LLC) cancers when THIO was used in *sequential combination* with anti-PD-L1 agent (atezolizumab). Combinations with other immune checkpoint inhibitors (*i.e.*, anti-PD-1 cemiplimab) were also effective [3].

In summary, our findings demonstrate the importance of cancer cell telomeric DNA structural and functional integrity, as well as therapeutically attractive opportunity to induce stress, increase innate sensing and adaptive antitumor immunity via “*cancer cell self-produced*” chemical modification of telomeres.

References

1. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine / I. Mender [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5 (1). – P. 82–95.
2. Wellinger, R.J. Turning Telomerase into a Jekyll and Hyde Case? / R.J. Wellinger // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5 (1). – P. 19–21.
3. Telomere Stress Potentiates STING-Dependent Anti-Tumor Immunity / I. Mender [et al.] // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 38 (3). – P. 400–411.
4. Dysfunctional telomeres trigger cellular senescence mediated by cyclic GMP-AMP synthase / S. Abdisalaam [et al.] // *J. Biol. Chemistry*. – 2020. – Vol. 295, № 32. – P. 11144–11160.

Биовыщелачивание бациллами силикатной железо-никелевой руды и золотоносного арсенопиритного минерального сырья

Абашина Т.Н., Носков А.Е., Вайнштейн М.Б.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБ РАН, Пущино, Россия,
электронный адрес: ttabashina@gmail.com*

Ряд исследований показал, что существуют бациллы, которые способны выщелачивать силикатное минеральное сырье и могут быть использованы в добыче металлов. Так, бактерии рода *Paenibacillus* разрушают силикатные руды, в результате чего в раствор выходят металлы.

Бактериальное растворение кварца в опытах с *P. mucilaginosus* происходит за счет разрушения силоксановой связи в присутствии галактозы, маннозы и других сахаров (Каравайко и др., 1984). При одинаковых условиях среды разрушение кварца силикатными бактериями оказалось в шесть раз активнее химического. При выращивании *P. mucilaginosus* в присутствии неизменных кимберлитов на среде, содержащей сахара, Е.Б. Наймарком с соавторами было показано, что бактерии резко увеличивают темпы трансформации кимберлитов, ускоряя вынос из породы Mg, Ca, Si. Таким образом, в присутствии гетеротрофных силикатных бактерий из руды преимущественно выщелачиваются силикатные минералы, строение которых включает ослабленную связь Si-O. Разрушение силоксановых связей при выщелачивании силикатных минералов с участием гетеротрофных микроорганизмов происходит в большей степени за счет действия их метаболитов. Можно предположить, что для переработки бедных силикатных никелевых руд перспективно использовать именно такие силикатные бациллы, позволяющие разрушить тетраэдрический слой силикатов и обеспечить доступ к металлам для их выщелачивания.

Использование силикатных бацилл имеет свои достоинства и недостатки в связи с тем, что они используют не кислотный, а другой, мало изученный, механизм деградации минерального сырья. Кислотное извлечение металлов – быстрый и эффективный процесс, тогда отсутствие потребности в использовании кислоты крайне замедляет прямое извлечение металлов, но делает процесс экологически выгодным. Деградация силикатного (а в случае изученного нами – алюмосиликатного арсенопиритного) сырья облегчает последующее извлечение металлов промышленным цианированием.

Выделены новые штаммы бактерий из силикатной железо-никелевой руды и золотоносного арсенопиритного минерального сырья *P. simplex* KZ-AR2, *B. zhanzhousensis* AR4, *B. mycoides* AR6, *C. firmus* B2, *R. beringensis* B3.

Проведены исследования по выщелачиванию силикатной железо-никелевой руды и золотоносного арсенопиритного минерального сырья выделенными нами силикатными бациллами в сравнении с типовым штаммом *P. mucilaginosus* ВКМ В-1480^Т. В опытах были использованы классическая для силикатных бацилл среда Белкановой, ее обогащенная модификация, а также разработанная нами новая среда для выщелачивания силикатных руд. Показателем биовыщелачивания силикатной никелевой руды был переход в раствор целевого металла никеля, а в случае золотоносного арсенопиритного сырья косвенным показателем его выщелачивания служил выход железа.

Сравнительный анализ выщелачивающей активности силикатных бацилл на разных средах показал:

1) выделенные новые штаммы силикатных бацилл, по своей выщелачивающей активности сопоставимые с типовым штаммом силикатных бацилл, но при этом консорциум этих бактерий показал более высокую выщелачивающую активность;

2) выделенные нами силикатные бациллы наравне с типовым штаммом способны выщелачивать и силикатную железо-никелевую руду, и арсенопиритное сырье;

3) конкретная активность зависит от вида сырья, используемой среды и условий выщелачивания. Разработанная нами среда оказалась лучше классической среды Белкановой для выщелачивания силикатной руды и хуже для выщелачивания арсенопиритного сырья, содержащего алюмосиликаты.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00380.

Технология биотрансформации дрожжевой биомассы с получением пептидов для производства косметических средств

Алексаночкин Д.И., Крестина Е.А., Фоменко И.А.

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ),
Москва, Россия,
электронный адрес: fomenkoia@mgupp.ru

В связи с растущим спросом на разнообразные косметические средства технология биотрансформации дрожжевой биомассы для получения пептидов с целью использования в косметике может стать достаточно перспективным методом. Макромолекулы, такие как белки, пептиды и полисахариды, являются агентами, улучшающими здоровье человека, которые можно использовать не только в косметической промышленности, но и в пищевой, а также в медицинской [1]. Натуральные вещества традиционно использовались в уходе за кожей на протяжении веков. В настоящее время ведется постоянный поиск новых природных биоактивных веществ, которые не только способствуют восстановлению кожи, но и защищают ее от разнообразных вредных факторов [2]. Такой поиск может приводить к использованию альтернативных сырьевых ресурсов, а также применению новых методов получения этих макромолекул. Внедрение биотехнологических решений может существенно упростить нынешнюю технологию производства пептидов и иметь положительный экономический эффект для их получения.

Так, например, получение биомассы *Saccharomyces cerevisiae* в промышленных масштабах превышает объемы производства любых других микроорганизмов более чем в 100 раз, и ожидается, что к 2026 году оно превысит 2 млн т [3]. Благодаря низкой себестоимости дрожжевой биомассы и структурным характеристикам она может служить мощным носителем разнообразных биологически активных веществ [4]. Преимущества дрожжевой биомассы, делают ее весьма перспективным сырьем для получения биологически активных пептидов.

В настоящее время существуют различные методы получения пептидов, позволяющие влиять на состав, последовательность и количество аминокислот, входящих в состав пептида, что приводит к изменению биоактивности [5]. Применение ферментативного гидролиза с целью деструкции клеточной стенки дрожжевых клеток с последующей химической обработкой, может приводить к выходу альбуминовой и глобулиновой фракций, которые в дальнейшем также подвергается ферментативному гидролизу протеолитическими ферментами с образованием пептидов различной молекулярной массы.

Пептиды дрожжевого происхождения, полученные в результате ферментативной биоконверсии, могут стать заменой многих химических веществ, используемых в косметике сейчас. Тем самым применение механизмов биотехнологии может привести к усовершенствованию процесса получения целевого продукта из микроорганизмов.

Список использованных источников

1. Advances in Antioxidative Bioactive Macromolecules / R. Song [et al.] // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – Vol. 512, № 1. – P. 1755–1768.
2. Michalak, M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process / M. Michalak // Internat. J. of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 585.
3. Attfield, P. Crucial aspects of metabolism and cell biology relating to industrial production and processing of *Saccharomyces* biomass / P. Attfield // Critical Reviews in Biotechnology. – 2022. – Vol. 1. – P. 1–18.
4. Salari, R. Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition / R. Salari // Electron Physician. – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. 3592–3597.
5. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides / D. Cruz-Casas [et al.] // Food chemistry: Molecular sciences. – 2021. – Vol. 3. – P. 1–12.

Скрининг бактерий рода *Acinetobacter* продуцентов биоПАВ

Алимова Б.Х., Вохидов Х.Т., Пулатова О.М., Махсумханов А.А.

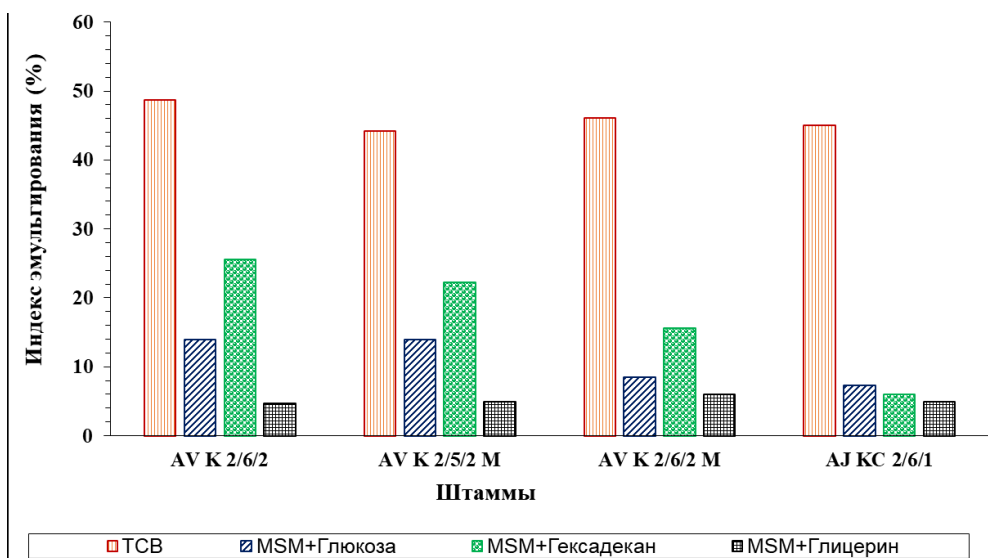
*Институт микробиологии АН РУз,
Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: balimova@list.ru*

Изучение и применение поверхностно-активных веществ микробного происхождения (биоПАВ) как экологически безопасных и эффективных соединений многоцелевого назначения вызывает большой научный и практический интерес, их считают многофункциональными биомолекулами 21 века. Их значение на мировом рынке растет: сегодня рынок биоПАВ оценивается в 2374 млн долл. США, и по прогнозам в течение 2022–2027 гг. среднегодовой темп роста составит более 5,5 % [1, 2]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования по выделению биоПАВ из различных микроорганизмов, однако бактерии рода *Acinetobacter* заслуживают особого внимания, поскольку биоПАВ синтезируемые этим родом бактерий, такие как «Эмульсан» и «Аласан» являются лучшими примерами коммерческого использования [3].

Цель исследования – скрининг бактерий рода *Acinetobacter* продуцентов биоПАВ. Объектом исследования служили 4 штамма, выделенные из загрязненных нефтепродуктами образцов почв и сточных вод Бухарского НПЗ с нефтегазовых скважин Кашкадарьинской области.

Способность штаммов бактерий рода *Acinetobacter* синтезировать биоПАВ изучали на среде ТСБ (г/л): экстракта говядины – 3,0; пептон – 10,0; NaCl – 5,0; а также на минерально-солевой среде (МСМ) содержащей (г/л): NaCl – 3,0; Na₂HPO₄ – 3,0; KH₂PO₄ – 2,0; (NH₄)₂SO₄ – 5,0; MgSO₄·7H₂O – 0,7 со значением pH 7,0–7,2 и 1 мл микроэлементов следующего состава (мг/л): CaCl₂ – 2; FeCl₃ – 30; CuSO₄ – 0,5; MnSO₄·xH₂O – 0,5; ZnSO₄·x7H₂O – 10, где в качестве источника углерода использовали глюкозу, глицерин или гексадекан (ГД) в концентрации 2 %. Эмульгирующую активность (ИЭ) определяли по методике Купера и Голденберга [4].

В результате проведенных исследований установлено, что при культивировании на среде ТСБ для всех 4 штаммов, ИЭ варьировал от 45 до 48,78 %. При культивировании штаммов на минеральной среде МСМ с различными концентрациями углеводов, через 48 ч культивирования высокий ИЭ наблюдался на среде, где в качестве источника углерода использовали ГД (см. рисунок). При изучении влияния различных концентраций ГД на рост и биосинтез биоПАВ установлено, что 4 % ГД является оптимальной концентрацией для культивирования штамма. Через 48 ч наблюдается увеличение ИЭ, к 96 ч культивирования максимальный ИЭ наблюдался у штаммов AV К 2/6/2 и AJ КС 2/5/2 М и составил 63,9 и 65,2 % соответственно.



Скрининг бактерий рода *Acinetobacter* на среде (МСМ) с различными источниками углерода

Таким образом, в результате скрининга были выделены и отобраны два штамма бактерий рода *Acinetobacter* – продуцента биоПАВ. Штаммы могут найти применение для биоремедиации загрязнённых нефтепродуктами почв и вод.

Список использованных источников

1. Olasanmi, I.O. The role of Biosurfactants in the Continued Drive for Environmental Sustainability / I.O. Olasanmi, R.W. Thring // SUSTAINABILITY. – 2018. – Vol. 10. – P. 4817. doi: org/10.3390/su10124817
2. Перспективы использования микробных биосурфактанов. / Б.Х. Алимова [и др.] // Узбек. биол. журн. – 2022. – № 2. – С. 14–24.
3. Biosurfactants: Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and Environmental Safety A Review. / E. Gayathiri [et al.] // Agronomy. – 2022. – Vol. 12. – P. 662. doi: org/10.3390/agronomy12030662
4. Surface-active agents from two *Bacillus species*. / D.G. Cooper [et al.] // App. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53, № 2. – P. 224–233.

Определение аутоагрегационной и коагрегационной способности штаммов лактобактерий

Амирсаидова Д.А., Бекмуродова Г.А.

Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: elova.nilufar@mail.ru

Важным параметром для отбора пробиотических бактерий является их адгезия к слизистой оболочке органов, которая обеспечивает благотворные для здоровья взаимодействия «бактерия – хозяин». Адгезия пробиотических бактерий к клеткам слизистой оболочки ротовой полости является обязательным условием при колонизации, защите от действия губительных факторов внутри организма и при обеспечении превосходства в конкуренции в этой экосистеме [1, 2]. Аутоагрегация пробиотических штаммов важная ступень при проявлении адгезивной способности, а способность к коагрегации важна при формировании барьера, который предотвращает от колонизации патогенными микроорганизмами [3].

Цель данной работы – оценка *in vitro* способности к аутоагрегации и коагрегации штаммов лактобактерий, кандидатов для создания новых пробиотиков с целью стабилизации нормофлоры полости рта.

В работе использовали 12 штаммов лактобактерий. Их агрегационную способность изучали методом, описанным в [6] с некоторой модификацией [4]. Коагрегационную способность штаммов МКБ и штаммов условно-патогенных микроорганизмов изучали методом, описанным в [5]. Оценку адгезивных свойств лактобактерий осуществляли методом В. И. Брилиса [6].

Установлено, что аутоагрегационная способность (АС) 12 штаммов лактобактерий колеблется от 26 до 52 % после 5 ч инкубации при 37 °С. Штаммы *Lactobacillus salivarius* OC 1 (46 %), *Pediococcus acidilactici* OC1 (48 %), *Lactobacillus rhamnosus* OC1 (48 %), *Lactobacillus acidophilus* 2 (54 %) показали наиболее высокую аутоагрегационную активность.

Среди исследованных культур рода *Pediococcus* штамм *P. acidilactici* OC1 показал сильную коагрегационную способность в отношении трех штаммов исследованных условно-патогенных микроорганизмов: *Enterobacter cloacae* 1, *Staphylococcus aureus* 3, *Enterobacter bugandensis* 22.

Среди трех штаммов *L. rhamnosus* штамм OC1 проявил наиболее сильную коагрегационную способность в отношении исследованных условно-патогенных микроорганизмов: *Enterobacter cloacae* 1, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* 3, *Staphylococcus epidermidis*. Штамм *L. plantarum* mal проявил сильную коагрегационную способность в отношении 6 исследованных условно-патогенных микроорганизмов: *Enterobacter cloacae* 1, *Escherichia*

coli 1, *Acinetobacter pittii* 1, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 3, *Staphylococcus epidermidis*. Штамм *L. fermentum* X проявил коагрегационную способность в отношении трех исследованных условно-патогенных микроорганизмов: *Enterobacter cloacae* 1, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*.

Установлено, что штаммы, обладающие наиболее высокой аутоагрегационной способностью (*P. acidilactici* OC1, *L. rhamnosus* OC1, *L. plantarum* mal, *L. fermentum* X), проявляют сильное коагрегационное взаимодействие по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. В том числе и штамм *Lactobacillus acidophilus* 2, который обладает высокой аутоагрегационной способностью, проявил коагрегационную активность по отношению к 6 штаммам патогенов: *Enterobacter cloacae* 1, *Acinetobacter pittii* 1, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 3, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter bugandensis* 22. Важно отметить, что коагрегационную способность данной культуры достигает высокой степени уже после 5 ч совместной инкубации.

В результате выполнения настоящей работы выявлен пробиотический потенциал штаммов лактобактерий, выделенных из ротовой полости, против колонизации ротовой полости патогенными штаммами. Исследованные штаммы продемонстрировали значительную аутоагрегационную и коагрегационную способности, которые обусловлены бактериальной адгезивностью к эпителиальным клеткам и поверхности слизистых оболочек и являются важными пробиотическими свойствами. Дальнейшие исследования пробиотических свойств этих штаммов МКБ могут привести к разработке коммерчески значимых пробиотических стартовых культур для производства новых функциональных пищевых продуктов и биопрепаратов.

Список использованных источников

1. Collado, M.C. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains / M.C. Collado, J. Meriluoto, S. Salminen // Eur. Food Res. Technol. – 2008. – Vol. 226. – P. 1065–1073.
2. Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability / M. Nikolic [et al.] // Eur. Food Res. Technol. – 2010. – Vol. 231. – P. 925–931.
3. In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens / C.L. Ferreira [et al.] // J. Food Prot. – 2011. – Vol. 74. – P. 1482–1487.
4. Collado, M.C. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains / M.C. Collado, J. Meriluoto, S. Salminen // Eur. Food Res. Technol. – 2008. – Vol. 226. – P. 1065–1073.
5. A Comparison of the Adhesion, Coaggregation and Cell-surface Hydrophobicity Properties of Fibrillar and Fimbriate Strains of *Streptococcus salivarius* / P.S. Handley [et al.] // J. of General Microbiol. – 1987. – Vol. 133. – P. 3207–3321.
6. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис [и др.] // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.

Получение аэрозоля на основе рекомбинантного противомикробного эндолизина LysECD7-SMAP

Антонова Н.П.¹, Горбачева М.А.², Вердиев Б.И.¹, Гушин В.А.¹, Васина Д.В.¹

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия,
электронный адрес: northernnatalia@gmail.com

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России», Москва, Россия

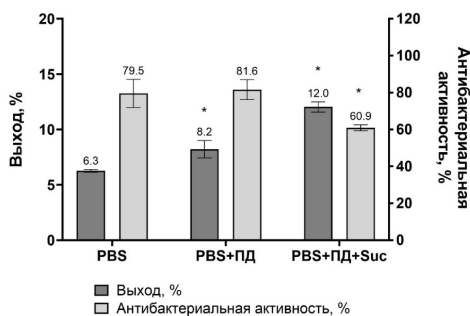
Литические ферменты бактериофагов (эндолизины) показали себя как перспективный класс антибактериальных средств, способных в эру глобальной лекарственной резистентности снизить развитие и распространение устойчивости бактерий к существующим антибиотикам [1]. Одним из вариантов их применения является лечение бактериальных пневмоний, для чего необходимо создание эффективных аэрозольных лекарственных форм. Однако распыление белков с помощью генераторов аэрозоля связано с механическим воздействием на них, что может привести к изменению конформации молекул и потере антибактериальной активности [2]. В настоящее время данная область фармацевтической разработки для препаратов на основе эндолизинов еще недостаточно изучена.

Целью данной работы стало изучение условий распыления растворов рекомбинантного модифицированного эндолизина LysECD7-SMAP, многообещающего бактерицидного фермента с выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий [3], при которых в процессе сбора аэрозоля сохраняются основные физико-химические и антибактериальные свойства фермента.

Для этого растворы различного состава, содержащие 1 мг/мл LysECD7-SMAP, распыляли в течение 5 мин с помощью компрессионного небулайзера Omron Com Air NE-C28-E (Япония), параллельно проводя сбор аэрозоля при помощи воздушного пробоотборника SASS® 2300 (США).

Показано, что при распылении раствор эндолизина в фосфатно-солевом буфере PBS (pH 7,4) без вспомогательных веществ образует плотную пену, а выход белка при сборе составляет 6,3 % от исходного количества. При добавлении к раствору 0,1 % пеногасителя Лапрол ПД-1 количество белка при сборе увеличивается до 8,2 %, а дополнительное внесение 5 % сахарозы в качестве стабилизатора – до 12,0 %. При этом, распыление не приводит к видимым изменениям и агрегации белка в собранных образцах, а ПААГ-электрофорез показал, что белок сохраняет свою целостность и не деградирует. Кроме того, исследование антибактериальной активности полученных после распыления растворов LysECD7-SMAP в отношении модельного клинического изолята *Acinetobacter baumannii* показало, что в концентрации 10 мкг/мл эндолизин, распыленный из буферного раствора без вспомогательных веществ (PBS) лизирует $79,5 \pm 7,6$ %

бактерий, из PBS с пеногасителем (PBS+ПД) – $81,6 \pm 5,4$ % бактерий, из PBS с пеногасителем и сахарозой (PBS+ПД+Suc) – $60,9 \pm 1,6$ % бактерий (см. рисунок), активность исходных растворов до распыления составляла 100 %.



Выход белка и антибактериальная активность собранных образцов в отношении *A. baumannii*.
* – значимые различия ($p < 0,05$) относительно группы PBS, однофакторный дисперсионный анализ

Таким образом, распыление эндолизина приводит к снижению его активности на 20–40 %, в зависимости от состава раствора. Так, добавление пеногасителя увеличивает выход белка в собранном аэрозоле, но не приводит к значимым изменениям активности белка относительно PBS, в то время как применение одновременно пеногасителя и стабилизатора увеличивает выход, однако, несколько снижает активность фермента по сравнению с раствором без вспомогательных веществ.

В результате работы мы подтвердили, что доставка в легкие эндолизина LysECD7-SMAP с сохранением антибактериальной активности в виде аэрозоля является потенциально достижимой и перспективной задачей исследований, а дальнейшая разработка лекарственных препаратов для ингаляционной терапии инфекционных заболеваний на основе эндолизинов требует тщательного подбора оптимальных эксципиентов в составе аэрозольной лекарственной формы.

Список использованных источников

1. Ghose, C. Gram-negative bacterial lysins / C. Ghose, C.W. Euler // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. e74.
2. Can bacteriophage endolysins be nebulised for inhalation delivery against *Streptococcus pneumoniae*? / Y. Wang [et al.] // Int. J. Pharm. – 2020. – Vol. 591. – P. e119982.
3. Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion / N.P. Antonova [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 1–18.

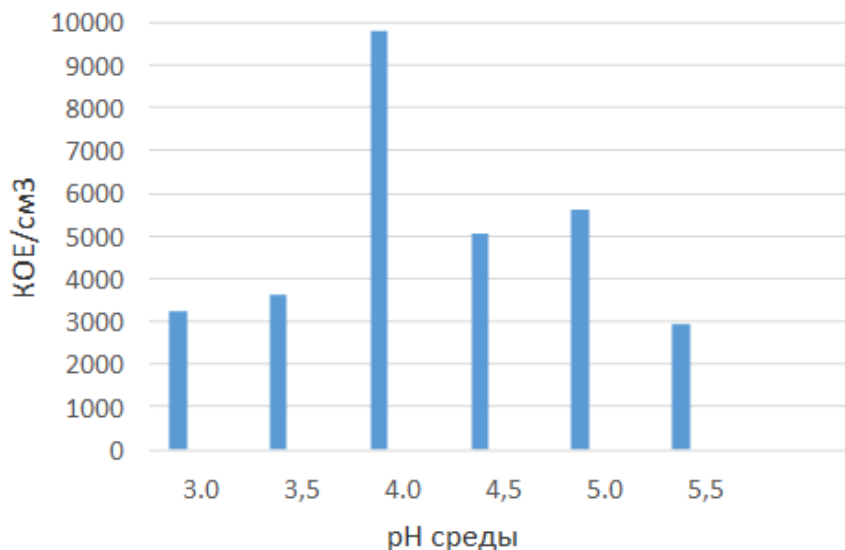
Возможность применение дрожжей *Saccharomyces boulardii* в качестве пробиотика в составе функционального продукта для профилактики желудочно-кишечных заболеваний

Барботин В.Р., Иванова Л.А.

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ),
Москва, Россия,
электронный адрес: exoforc@yandex.ru

Дрожжи *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 – это один из немногих представителей небактериальных пробиотиков. От бактерий они отличаются размером и устойчивостью к антибиотикам. Эти дрожжи назначают для профилактики или лечения диареи, вызванной приемом антибиотиков [1]. Они обладают иммунологическим, патогеносвязывающим действием, положительно воздействует на микробиоту кишечника, вырабатывают ряд пищеварительных ферментов [2].

В исследованиях использовался штамм пробиотических дрожжей *S. boulardii* CNCM I-745 из коллекции ФГБОУ ВО Российского биотехнологического университета. Штамм способен расти при низких значениях pH среды. Наибольший рост биомассы на меласной среде наблюдался при pH 4,0, при pH 3,0 и 3,5 рост продолжался, но был значительно меньшим, как показано на рисунке.



Влияние кислотности среды на рост культуры

S. boulardii хорошо растет при температуре 36–37 °С, что соответствует температуре кишечной среды человека. Дрожжи устойчивы в кислотной среде желудка. Эксперименты показали, что в искусственной желудочной среде (рН 2) при инкубировании в течение 1 ч выживает 60 % колониеобразующих единиц, в течение 2 ч – 30 %. Однако следует учитывать, что пища повышает показатель рН в желудке, что увеличивает и выживаемость клеток.

S. boulardii были использованы в качестве пробиотика в составе ягодного сорбета. Исследование показало, что при хранении сорбета, обогащенного дрожжевой культурой, ее жизнеспособность сохраняется в течении двух недель при – 18 °С. На основе проведенных исследований был сделан вывод, что сорбет может быть носителем пробиотических дрожжей и использоваться для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Он обладает сладким, насыщенным ягодным вкусом.

Список использованных источников

1. Czerucka, D. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections / D. Czerucka, P. Rampal // World J. Gastroenterol. – 2019. – Vol. 25. – P. 2188–2203. doi: org/10.3748/wjg.v25.i18.2188
2. Moré, M.I. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Improves Intestinal Enzyme Function: A Trophic Effects Review / M.I. Moré, Y. Vandenplas // Clin. Med. Insights Gastroenterol. – 2018. – Vol. 11. doi: org/10.1177/1179 552 217 752 679

Ферментативный синтез фосфолипидного производного N4-гидроксицитидина

Биричевская Л.Л.¹, Ханчевский М.А.², Квасюк Е.И.², Зинченко А.И.^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: larbir@mail.ru

²МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

Считается, что самым эффективным средством борьбы с пандемией COVID-19 является вакцинация. Однако не исключена вероятность того, что вакцины против быстро мутирующего коронавируса будут так же быстро терять свою эффективность. Это обстоятельство оправдывает усилия на создание лекарств прямого противовирусного действия.

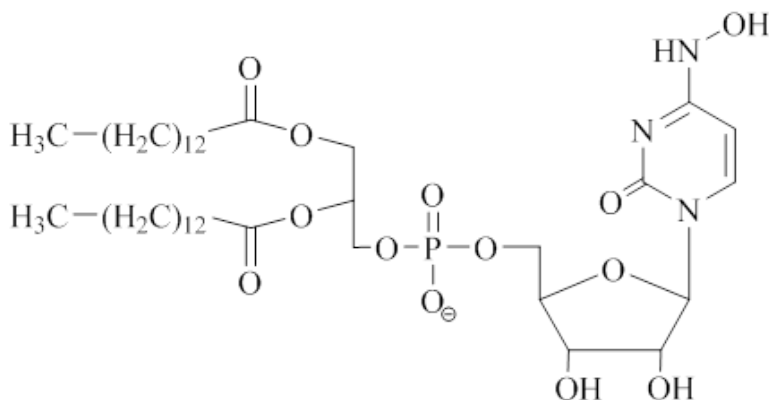
По химической природе большинство известных противовирусных препаратов представляют собой модифицированные нуклеозиды, которые, однако, сами по себе активностью не обладают. Для превращения в активную субстанцию они должны в клетке подвергнуться метаболической активации, заключающейся в поэтапном превращении нуклеозида в нуклеозид-5'-трифосфат. Научная идея авторов заключается в предложении использовать в качестве противовирусных препаратов не сами нуклеозиды, а их 5'-фосфатидильные производные, что, предположительно, сократит путь метаболической активации субстанции, а также улучшит ее фармакодинамические характеристики.

Модифицированный аналог цитидина – N4-гидроксицитидин (далее гидроксицитидин) (EIDD-1931) обладает широким спектром противовирусной активности против различных РНК-содержащих вирусов, включая вирус гепатита С, вирус Эбола и вирус гриппа. Это соединение является активной формой молнупиравира (EIDD-2801) – препарата, который представляет собой 5'-изопропиловый эфир гидроксицитидина и в настоящее время проходит фазу III клинических испытаний при лечении пациентов с COVID-19.

Ранее нами была показана принципиальная возможность применения фосфолипазы D *Streptomyces netropsis* БИМ В-428Д (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов) для получения 5'-димиристоилфосфатидил-гидроксицитидина (см. рисунок) [1]. Целью настоящего исследования являлась разработка метода препаративного получения и наработка экспериментального образца 5'-фосфатидил-гидроксицитидина.

Использованный в работе гидроксицитидин синтезировали методом, описанным в сообщении [2].

Синтез фосфолипидного производного проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 50 мл, состоящей из 33,5 мл дихлорметана и 16,5 мл водной фазы, представляющей собой 0,2 М натрий-ацетатный буфер (рН 6,0)



Структура молекулы 5'-димиристоилфосфатидил-гидроксицитидина

с 0,15 М CaCl_2). Реакционная смесь содержала 130 мг (500 $\mu\text{моль}$) гидроксицитидина, 630 мг (750 $\mu\text{моль}$) соевого лецитина и 15 мг сухого препарата («ацетонного порошка») фосфолипазы D.

Реакцию осуществляли при температуре 37 °С и постоянном интенсивном перемешивании. Ход реакции синтеза контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия) в системе растворителей хлороформ/метанол/вода (7:3:0,8 об.). Нуклеозид с пластин элюировали водой, а фосфолипидное производное – этанолом. Величину поглощения элюатов регистрировали при длине волны 238 нм. Конверсия нуклеозида в целевой продукт составила 84 мол. % через 75 мин после начала реакции.

По окончании реакции органический слой, содержащий фосфолипиды, двукратно отмыли дистиллированной водой, отделили центрифугированием и упарили. Очистку целевого фосфатидилнуклеозида осуществляли на колонке объемом 204 мл, заполненной силикагелем Silica gel 60 (0,040–0,063 мм) («Merck», Германия), элюируя соединения ступенчатым градиентом метанола (10–35 %) в дихлорметане. Хроматографические пики обнаруживали с помощью УФ-детектора (контроль поглощения при длине волны 190, 210, 236 и 260 нм). Фракции, содержащие хроматографически чистое (контроль методом ТСХ) целевое соединение, объединяли и упаривали с использованием роторного испарителя при 30 °С.

Получено 210 мг (230 $\mu\text{моль}$) субстанции 5'-фосфатидил-гидроксицитидина. Выход составил 46 мол. % в пересчете на внесенный нуклеозид. Чистота полученного соединения – не менее 95 % по данным ТСХ. Структура вещества подтверждена данными УФ-спектроскопии. УФ-спектр спиртового раствора: $\lambda_{\text{макс}}$ – 238 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ – 280 нм. Полученное соединение также положительно окрашивается специфическим реагентом на фосфолипиды (реактив Васьковского) и аминогруппу (хлорид железа III).

Полученный образец планируется использовать для исследования противовирусной активности 5'-фосфатидил-гидроксицитидина в сравнении с исходным нуклеозидом.

Список использованных источников

1. Молнупиравир как перспективное пролекарственное средство для терапии COVID-19 / Л.Л. Биричевская [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2022. – Т. 14. – С. 292–306.
2. Concise route to МК-4482 (EIDD-2801) from cytidine / V.A Natarajan [et al.] // Chem. Commun. – 2020. – Vol. 56. – P. 13363–13364. doi: 10.1039/D0CC05944G

Получение и исследование противоопухолевой активности химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» на модели асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*

Булатовский А.Б.¹, Зинченко А.И.¹, Веялкина Н.Н.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: a.bulatovski@yandex.by

²Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

Как известно, фосфатидилсерин (ФС) на поверхности раковой клетки может служить маркером, позволяющим отличать его от нормальной клетки и осуществлять при необходимости целенаправленную доставку в опухоль различных фармакологических агентов [1, 2]. Для обеспечения доставки фармацевтического вещества в опухоль используют молекулярный транспортер для распознавания ФС на поверхности опухолевой клетки. Аннексин А5 человека может действовать в качестве такого переносчика, который связывается с высоким сродством с ФС [3, 4].

Асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), модель опухоли молочной железы мыши, представляет собой быстро растущую недифференцированную злокачественную опухоль с очень агрессивным поведением, способную расти практически у всех штаммов мышей и часто используемую в исследованиях рака [5]. Изучение химиотерапевтических препаратов на модели АКЭ позволяет применять ее для широкого круга экспериментальных задач, в том числе при тестировании новых лекарственных форм [6].

Целью данной работы явилось получение очищенных химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» и проверка их противоопухолевой активности на модели АКЭ Эрлиха *in vivo*.

На начальном этапе работы производили наработку биомассы и индукцию синтеза белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» в клетках *E. coli* БИМ В-1223 Г и *E. coli* БИМ В-1411 Д. Далее при помощи металл аффинной хроматографии проводили очистку химерных белков.

В эксперименте по определению противоопухолевой активности были использованы самки мышей линии BALB/c в возрасте 2,5–3 мес. Животных содержали в условиях стационарного вивария Института радиобиологии НАН Беларуси на полноценном стандартном пищевом рационе и свободным доступом к воде, 12/12-часовом режиме освещения и темноты, согласно установленным нормам.

Для прививки опухоли животным вводили по 0,1 мл суспензии клеток АКЭ ($9 \cdot 10^6$ клеток) в область первой пары молочной железы у правой передней конечности животного.

Начиная с 5 сут прививки опухоли животным двух групп вводили препараты химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» в область образования опухолевого узла, в дозе 5 мг/кг веса животного. Контрольной группе животных вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия в соответствующем объеме.

Наблюдение за состоянием животных вели на протяжении всего экспериментального периода. На 22-е сут эксперимента выполнялся рентгеновский снимок при помощи установки для облучения биологического назначения X-RAD 320 с системой OptiMAX (Precision X-Ray Inc., США), для чего мышь наркотизировали и фиксировали на специальной подложке. Далее полученные изображения обрабатывали при помощи программного пакета ImageJ (Precision X-Ray Inc., США). Величины площади опухолевого узла использовали для расчета процента торможения роста опухоли.

В результате работы были получены химерные белки «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» в количестве 56 и 73 мг соответственно с чистотой не менее 95 %. Проверка их противоопухолевой активности на мышах, показала, что при введении исследуемых белков снижение массы тела животных было менее выражено. На 22-е сут эксперимента прирост массы тела животных контрольной группы, без учета массы опухолевого узла, был отрицательным и составлял –8,31 %, от начальной массы тела животных. При введении раствора белка «Аннексин-АДаза» прирост массы тела животных составлял –4,85 %, а при введении «Аннексин-ПНФаза» – –0,83 %, коэффициент торможения роста опухоли составил 36,83 и 24,10 % соответственно. Это показывает, что при введении исследуемых химерных белков рост опухоли у исследуемых групп замедляется по сравнению с контрольной группой.

Список использованных источников

1. In search of new targets – the membrane lipid phosphatidylserine – underestimated Achilles' heel of cancer cells / D. Zweyck [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 22, suppl. 3. – P. 43.
2. In search of a novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1808. – P. 2638–2645.
3. Schick, P.K. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane / P.K. Schick, K.B. Kurica, G.K. Chacko // *J. Clin. Invest.* – 1976. – Vol. 57. – P. 1221–1226.
4. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers / H.A. Andree [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 4923–4928.
5. Tokalov, S.V. Radiation-induced cell cycle arrests in Ehrlich ascites carcinoma cells *in vivo* / S.V. Tokalov, A.S. Iagunov // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2011. – Vol. 50. – P. 265–270.
6. Рыжова, Н.И. Значение модели аденокарциномы Эрлиха в изучении механизмов канцерогенеза, противоопухолевой активности химических и физических факторов / Н.И. Рыжова, В.П. Дерягина, Л.А. Савлущинская // *Междунар. журн. прикладных и фундамент. исслед.* – 2019. – № 4. – С. 220–227.

Получение наночастиц хитозана в комплексе с 3',5'-циклическим диаденозинмонофосфатом

Винтер М.А., Казловский И.С., Зинченко А.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь,
электронный адрес: rita.vinter.abc@gmail.com*

Продолжающаяся пандемия COVID-19, вызванная респираторным вирусом SARS-CoV-2, и существующая вероятность появления новых пандемических вирусов диктуют необходимость поиска современных противовирусных средств.

Ранее нами предложено [1] в качестве универсального противовирусного средства использовать недавно открытый у бактерий и архей фармакологически перспективный 3',5'-циклический диаденозинмонофосфат (цикло-диАМФ), который в природе выполняет роль индуктора видоспецифичного эндогенного интерферона. Молекула этого динуклеотида неустойчива в русле крови и может с трудом проникать в иммунциты [2].

Целью нашей работы являлось повышение устойчивости цикло-диАМФ путем его наноструктурирования в составе комплексов с хитозаном.

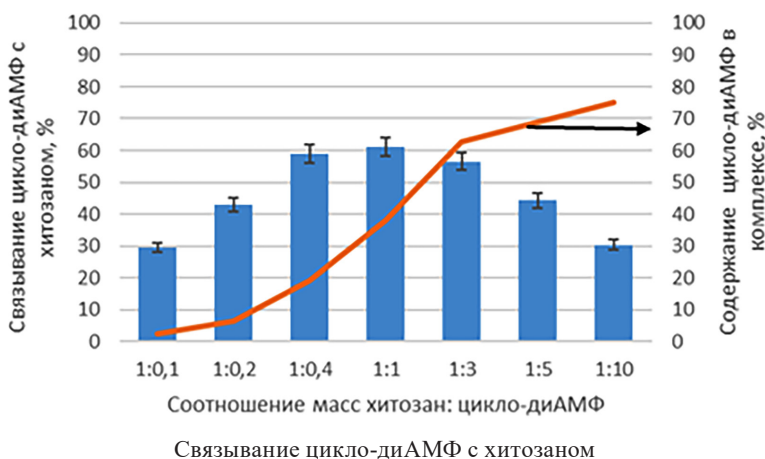
В настоящей работе в ходе синтеза наночастиц хитозана, включающих цикло-диАМФ, мы воспользовались методом ионотропного гелеобразования, поскольку он прост и не требует применения токсических сшивающих агентов и органических растворителей.

Для синтеза комплексов хитозана с цикло-диАМФ хитозан фирмы Acros Organics (Бельгия) с молекулярной массой 100–300 кДа и степенью деацетилирования 75 % растворяли в 1%-ном растворе уксусной кислоты до концентрации 1 мг/мл. К приготовленному раствору хитозана добавляли по каплям при перемешивании и комнатной температуре 0,1 % водный раствор цикло-диАМФ, синтезированный как описано нами в работе [3]. Полученную суспензию центрифугировали (10 000 g, 10 мин). Образовавшийся осадок дважды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 60 °С в течение 24 ч.

Эффективность включения цикло-диАМФ в состав получаемых наночастиц хитозана и емкость получаемых комплексов в отношении введенного цикло-диАМФ оценивали путем спектрофотометрического ($\lambda = 259$ нм) определения его концентрации в супернатанте после осаждения частиц комплекса.

Для определения степени элюции цикло-диАМФ из наночастиц навеску полученного комплекса ресуспендировали в дистиллированной воде или в цитрат-фосфатном буфере, инкубировали при комнатной температуре и через определенные промежутки времени центрифугировали. Степень элюции цикло-диАМФ оценивали спектрофотометрически.

Полученные результаты комплексообразования приведены на рисунке. Как видно, в наших экспериментальных условиях порядка 60 % введенного в реакцию динуклеотида способно связываться с хитозаном. Емкость полученных комплексов в отношении цикло-диАМФ достигала 0,8–0,86 мг динуклеотида/мг комплекса (при соотношении масс хитозана и цикло-диАМФ 1:10).



Таким образом, нами впервые было экспериментально продемонстрировано связывание цикло-диАМФ с хитозаном с образованием наночастиц.

Элюция цикло-диАМФ в цитрат-фосфатный буфер (рН 7,4) почти за сутки достигает 38 %, а в условиях ацидоза (при рН 4,5) высвобождение цикло-диАМФ из комплексов достигает 49 % за 21 ч. Отмеченный факт высвобождения цикло-диАМФ из его комплексов с хитозаном в слабокислых условиях свидетельствует в пользу возможности использования изученных комплексов в качестве системы пролонгированной доставки изучаемого динуклеотида в клетки-мишени.

Список использованных источников

1. Зинченко, А. Интерфероны и их индукторы как элементы борьбы с COVID-19 / А. Зинченко, М. Винтер, И. Казловский // Наука и инновации. – 2023. – № 2. – С. 24–29.
2. Nanoparticle delivery improves the pharmacokinetic properties of cyclic dinucleotide STING agonists to open a therapeutic window for intravenous administration / M. Wehbe [et al.] // J. Control. Rel. – 2021. – Vol. 330. – P. 1118–1129. doi: org/10.1016/j.jconrel.2020.11.017
3. Vinter, M.A. Construction of bacterial strain forming inclusion bodies, exhibiting diadenylate cyclase activity / M.A. Vinter, I.S. Kazlouski, A.I. Zinchenko // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. Ин-та генетики и цитологии НАН Беларуси. – 2022. – Т. 33. – С. 105–109. doi: org/10.476612/1999-9127-2022-33-76-82

Результаты оценки острой токсичности антибактериального пептидного комплекса из лейкоцитов человека

Волков А.Г.

*ФГБОУ ВО «Пермский медицинский университет им. Е.А. Вагнера», Пермь, Россия,
электронный адрес: 89991266866@mail.ru*

Проблема нерациональной антибиотикотерапии в настоящее время носит глобальный характер. В амбулаторной практике антибиотики зачастую назначаются при вирусных инфекциях, в первую очередь – при ОРВИ. В период пандемии COVID-19 многим пациентам были назначены антибиотики, несмотря на то, что они не обеспечивают лечение вирусной инфекции [1]. Это привело к нерациональному использованию антибиотиков и ускорению процесса развития антибиотикорезистентности у микроорганизмов [2].

Пермским национальным исследовательским политехническим университетом совместно с Пермским медицинским университетом им. Е.А. Вагнера разработана технология получения новых антибактериальных пептидов из лейкоцитов человека с использованием ультразвукового воздействия [3].

В настоящее время разработанные субстанции проходят доклинические исследования. Одним из основных критериев безопасности лекарственных средств является изучение их общетоксического действия [4]. Метод В. Б. Прозоровского, состоящий в наблюдении за выживанием мышей после введения определенной дозы тестового вещества, является одним из методов, используемых для этой цели.

Исследуемое соединение, взятое в четырех дозах, вводили внутривентриально. Каждой паре животных вводили одну дозу в порядке возрастания. Результаты изучения острой токсичности показали, что исследуемые лейкоцитарные пептиды относятся к 6-му классу токсичности по классификации К.К. Сидорова и к 4-му классу токсичности по ГОСТ 12.1.007-76, т. е. являются малотоксичными субстанциями.

Таким образом, результаты доклинических токсикологических исследований, направленные на выявление выраженности токсических эффектов, возникающих при взаимодействии фармакологического вещества с организмом лабораторных животных, позволяют сделать вывод о безопасности разработанной субстанции и возможности проведения дальнейших более углубленных исследований.

Список использованных источников

1. Antibiotic Misuse during COVID-19 Pandemic: Review Study / A.M. Kharshid [et al.] // Pharmacologyonline. – 2021. – Vol. 3. – P. 1038–1047.

2. Recommendations for antibacterial therapy in adults with COVID-19 – An evidencebased guideline / E. Sieswerda [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2020. – Vol. 27. – P. 61–66.

3. Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г. Способ фракционирования лейкоцитарных белков : пат. РФ № 2737730 от 2 дек. 2020 г. / Л.В. Волкова, Т.А. Гришина, А.Г. Волков. – Заяв. № 2019114590 от 13.05.2019.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. – М. : Гриф и К°, 2013. – 944 с.

Применение целлюлолитических ферментных препаратов в технологии получения изолята белка из жмыха рапсового

Дегтярев И.А., Фоменко И.А., Иванова Л.А.

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ),

Москва, Россия,

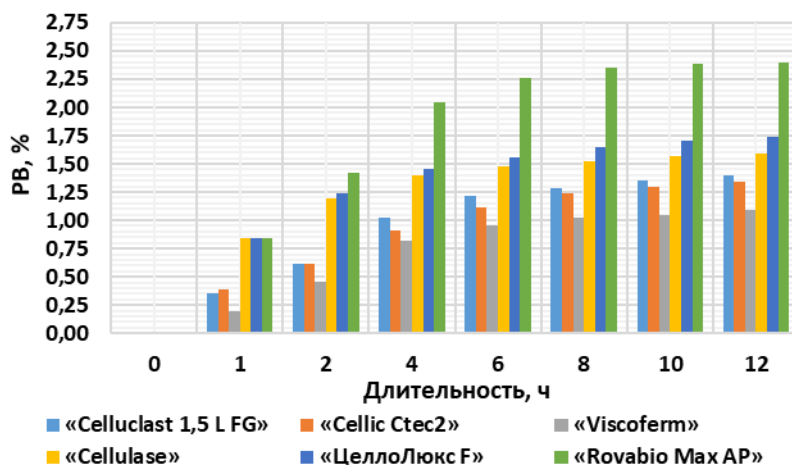
электронный адрес: iadegtyarev@mail.ru, iv.fomenko@mail.ru

Использование ферментных препаратов (ФП) в масложировой отрасли позволяет заменить стадию экстракции органическими растворителями, в технологиях получения белка из отходов переработки масличных культур – увеличить выход и качество целевого продукта [1]. Жмых рапса – высокобелковый отход, образующийся в процессе получения рапсового масла. Содержание «сырого» протеина в жмыхе достигает 40 %, остаточная масличность – 15 %, содержание сырой клетчатки – 15 % [2]. Белковая фракция может быть извлечена с получением белкового концентрата и изолята. Для повышения количества экстрагированных белков необходимо снизить содержание углеводной фракции.

В работе использовали жмых рапсовый, произведенный на предприятии ООО «Лебяжский ЗРМ» (Киров, Россия), со следующими показателями: сырой протеин – $36,12 \pm 1,27$ %, сырая клетчатка – $12,56 \pm 1,54$ %, сырой жир – $16,62 \pm 0,83$ %.

Обезжиренный рапсовый жмых с содержанием остаточного жира менее 1,00 % получен путем замачивания в гексане в соотношении экстрагент-сырье 5:1, при температуре 40 °С в течение 1 ч при скорости перемешивания 180 об/мин. Для проведения гидролиза готовили 11%-ную суспензию обезжиренного рапсового жмыха с добавлением ФП. Об эффективности процесса судили по количеству редуцирующих веществ, образующихся в результате гидролиза (см. рисунок).

После экстракции жира жмых подвергали ферментативному гидролизу клетчатки с использованием следующих коммерческих ферментных препаратов, представленных в таблице. Процесс ферментативного гидролиза целесообразно осуществлять в течение 4 ч. Последующее увеличение длительности гидролиза во всех вариантах опыта позволяет получить выход РВ на 0,5 % больше в сравнении с 4-часовым процессом. При выбранной длительности выход РВ составил $2,05 \pm 0,2$ % с использованием ФП «Rovabio Max AP», с «Cellulase» $1,40 \pm 0,1$ % и с «ЦеллоЛюкс F» $1,45 \pm 0,1$ %. Наименьшее количество РВ образуется (менее 1,50 %) с использованием всех испытанных ФП компании «Novozymes».



Ферментативный гидролиз обезжиренного рапсового жмыха с применением коммерческих ФП

Рекомендуемая температура, pH и дозировка ФП, используемых ФП, согласно данным производителей

Наименование ФП	Производитель	Температура, °C	pH
«ЦеллоЛюкс F»	ООО «СИББИОФАРМ»	35–65	3,5–6,0
«Celluclast 1,5 L FG»	«Novozymes»	50–60	4,5–6,0
«Cellic Ctec2»	«Novozymes»	50–70	4,5–6,0
«Viscoferm»	«Novozymes»	50–60	5,0–6,0
«Rovabio Max AP»	«Adisseo»	50–60	3,5–6,0
«Cellulase»	«Heilongjiang Winovazyme biotech Co»	30–70	3,0–6,5

Применение ферментных препаратов позволяет проводить деструкцию некрахмальных полисахаридов жмыха рапса в «мягких» условиях, что имеет ряд преимуществ в сравнении с химическими методами гидролиза. Для осуществления ферментативного гидролиза рапсового жмыха карбогидразами целесообразно применять «Rovabio Max AP», «ЦеллоЛюкс F» и «Cellulase», однако имеется необходимость в уточнении параметров гидролиза с целью повышения эффективности процесса.

Список использованных источников

1. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application / J. Liu [et al.] // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2016. – Vol. 35. – P. 184–193. doi: org/10.1016/j.ifset.2016.05.002
2. Ancuța, P. Oil press-cakes and meals valorization through circular economy approaches: A review / P. Ancuța, A. Sonia // Applied Sciences. – 2020. – Vol. 10. – № 21. – P. 7432. doi: org/10.3390/app10217432.

Использование сои в качестве альтернативного сырья в пивоваренной промышленности

Жданова А.Э.¹, Голубева Д.А.², Шаненко Е.Ф.², Фоменко И.А.¹

¹ *Институт биотехнологии и глобального здоровья,
Российский биотехнологический университет, Москва, Россия,
электронный адрес: FomenkoIA@mgipp.ru*

² *Институт пищевых систем и здоровьесберегающих технологий,
Российский биотехнологический университет, Москва, Россия*

Пивоварение вносит особый вклад в экономическое развитие пищевой промышленности РФ. Высокая прибыль с данным секторе АПК обеспечивает развитие смежных отраслей [1]. Однако в связи с популяризацией науки потребители все большее внимание обращают на состав продукта, и, как следствие, это отражается на спросе на новые напитки и продукты питания. Использование альтернативных источников сырья позволит повысить биологическую ценность пивных напитков наряду с расширением ассортимента продукции. Для развития технологий пивных напитков на основе альтернативного сырья особый интерес представляет использование культур, субсидируемых государством. К таким культурам относится соя: ее количество в РФ с каждым годом растет: за период с 2016 по 2020 г. валовый сбор сои в России вырос с 3,35 до 4,51 млн т, или на 34,6 %, в связи с этим актуален поиск путей реализации данной продукции [2]. Соевые бобы содержат большое количество растительного белка, аминокислотный состав которого включает все 8 незаменимых аминокислот, их количественное содержание варьируется в зависимости от биологических особенностей конкретного сорта [3].

В исследовании Ю.Ю. Миллер и др. получены положительные результаты биохимических и органолептических показателей напитка из смеси соевого и ячменного солодов. Предварительную обработку сырья осуществляли внесением на стадии замачивания комплекса кислот из цикла Кребса [4]. Однако в технологии получения соевого солода остается актуальным поиск низкотратных и эффективных способов скарификации соевых бобов ввиду наличия в них фитиновой кислоты, ингибиторов ферментов и др. Для снижения их количества традиционно используют стадии замачивания, проращивания или же воздействуют на сырье термически [5]. Повысить эффективность данным способом возможно внесением однокомпонентных фиторегуляторов. Янтарная кислота позволяет создать рН 4,25 при замачивании, который частично снижает количество лептинов сои и минимизирует риск контаминации соевых семян [6, 7]. Это вещество также обладает ростстимулирующими свойствами,

что может благоприятно повлиять на активацию эндогенных амилолитических и протеолитических ферментов сои [8].

Использование протеолитических ферментных препаратов открывает возможность получения напитков брожения с растворимыми пептидами и свободными аминокислотами сои, которые способны повысить биологическую ценность продукта. Дополнительным преимуществом использования протеаз, а именно ферментного препарата «Протосубтилин», производимого ООО ПО «Сиббиофарм», является его каркасообразующие свойства, стабилизирующие пену [9].

Список использованных источников

1. Хрестина, С.Ф. Пивоваренная промышленность и ее значение как отрасли агропромышленного комплекса / С.Ф. Хрестина, М.Е. Озеряник, Е.Е. Румянцева // Научное обеспечение отрасли растениеводства и землеустройства сельскохозяйственных предприятий : материалы Всерос. (нац.) науч.-практ. конф., Нижний Новгород, 6–7 окт. 2021 г. / Нижегород. гос. сельскохозяйств. акад. ; редкол.: Н.Ю. Бармин [и др.]. – Нижний Новгород, 2022. – С. 139–144.
2. Лукомец, А.В. Экономика производства и развитие рынка сои в России / А.В. Лукомец // Фундаментальные и прикладные исследования кооперативного сектора экономики. – 2021. – № 4. – С. 106–113.
3. Использование сои в производстве продуктов питания и перспективы развития применения соевых полуфабрикатов в производстве хлебобулочных изделий / Н.Н. Типсына [и др.] // Вестн. КрасГАУ. – 2021. – № 1. – С. 163–168.
4. Миллер, Ю.Ю. Формирование качественных характеристик соевого солода посредством использования активатора роста органической природы / Ю.Ю. Миллер, Т.Ф. Киселева, Ю.В. Арышева // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 2. – С. 248–259.
5. Germination improves the functional properties of soybean and enhances soymilk quality / M. Hu [et al.] // International Journal of Food Science & Technology. – 2022. – Vol. 57, № 7. – P. 3892–3902.
6. Алёшин, В.Н. Влияние органических кислот на антипитательные вещества семян сои и клешевины / В.Н. Алёшин, Г.А. Купин // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2015. – № 11. – С. 28–30.
7. Бурлака, С.Д. Перспектива использования органических кислот и их солей в качестве лечебно-профилактических добавок к напиткам / С.Д. Бурлака, А.А. Алексеева, Г.Ф. Музыченко // Инновационные технологии в науке нового времени. – 2017. – № 3. – С. 21–22.
8. Якунина, А.В. Влияние салициловой и янтарной кислот разных концентраций на всхожесть и рост бобовых / А.В. Якунина, Ю.В. Сеницына // МНИЖ. – 2022. – № 6-2 (120). – С. 24–28.
9. Изучение влияния ограниченного протеолиза на пенообразующую способность соевых продуктов / Н.В. Хабибулина [и др.] // Ceteris paribus. – 2015. – № 2. – С. 5–7.

Некоторые новые подходы к терапии онкологических заболеваний

Зинченко А.И., Биричевская Л.Л., Казловский И.С., Булатовский А.Б., Винтер М.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by*

По причине чрезвычайного разнообразия и изменчивости форм рака под термином «рак» сейчас следует понимать большое число заболеваний, которые требуют индивидуальной диагностики и персонализированного лечения. Поэтому нам представляется, что наиболее рационально для терапии рака использовать сочетание (рассчитывая на синергизм) трех подходов, основанных на применении таргетной химиотерапии, иммуностропной биотерапии и вакцинации.

Химиотерапия (атака на теломеры). В 2016 году в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси впервые с помощью ферментов воспроизведен синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина (6ТДГ) [1] (рис. 1) – модифицированного нуклеозида, который, по данным американских исследователей (MAIA Biotechnology, Inc., Чикаго, США), может стать субстанцией для весьма перспективного противоопухолевого препарата необычайно-широкого спектра действия [2].

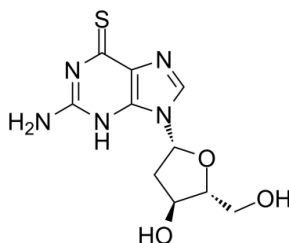


Рис. 1. Структурная формула 6ТДГ

Действительно, по литературным данным, 6ТДГ обладает уникальным механизмом противоопухолевого действия, не похожим на известные механизмы. Этот нуклеозид-антиметаболит под видом обычного 2'-дезоксигуанозина способен включаться в теломерные участки хромосом только раковых клеток. Структура теломер при этом настолько изменяется, что это «вынуждает» клетку совершить запрограммированное самоубийство – апоптоз. Указанная особенность 6ТДГ определяет возможность его использования в качестве противоопухолевого лекарственного средства, обладающего высокой избиратель-

ностью по отношению к раковым клеткам и низкой токсичностью для нормальных тканей.

В настоящее время в лаборатории молекулярной биотехнологии изучается возможность ферментативного синтеза конъюгатов бТДГ с различными фосфолипидами с целью обнаружить соединения с улучшенными по сравнению с родительским нуклеозидом фармакологическими показателями [3].

Биотерапия (атака на аденозин). Известно, что одним из ключевых факторов, приводящих к формированию иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей, служит внеклеточный аденозин, концентрация которого при перерождении нормальной ткани в опухолевую возрастает в 1000 раз. Этим подавлением «хозяйского» противоопухолевого иммунитета объясняется так называемый парадокс Хелстрема, который проявляется в одновременном нахождении в организме онкологического больного опухолевых клеток и антиопухолевых иммуноцитов. Устранение «барьера» между этими клетками могло бы иметь значительный терапевтический потенциал и содействовало бы созданию препаратов, по механизму действия в корне отличающихся от традиционных противоопухолевых средств.

Нами предложен способ активации хозяйского иммунитета с помощью аденозиндеградирующих ферментов (в частности, аденозиндезаминазы и пурипнуклеозидфосфорилазы), слитых с человеческим белком аннексином-А5 [4, 5]. Этот белок был выбран по причине его сродства к фосфатилсерину – липиду, находящемуся на поверхности раковых клеток. С целью реализации этой идеи на практике, нами, используя генно-инженерную технику, были созданы рекомбинантные штаммы бактерий – продуценты аденозиндезаминазы и пурипнуклеозидфосфорилазы, слитых с аннексином А5.

Имеются научные основания полагать, что при введении в организм онкологического больного эти химерные белки будут концентрироваться (благодаря аннексиновой части) только в опухолях, где ферменты будут расщеплять аденозин, ликвидируя его иммуносупрессивное влияние.

Вакцинация in situ. Этот термин введен в научный обиход сравнительно недавно для обозначения особого способа формирования противоопухолевого иммунитета у человека и животных. Соответствующая процедура заключается в частичном разрушении (аблации) опухоли, приводящем к высвобождению из погибших клеток широкого профиля опухолевых белков-антигенов, что в сочетании с вводимыми в опухоль адьювантами превращает поврежденную опухоль в своеобразную вакцину.

Нами предложена идея для противоопухолевого вакцинирования *in situ* использовать препарат, состоящий из двух компонентов [6]:

бактериальной плазмиды с иммуностимулирующими CpG-динуклеотидами, изолированной из специально сконструированного нами штамма кишечной палочки;

природного циклического динуклеотида 3',5'-циклического диаденозинмонофосфата (цикло-ди-АМФ), синтезированного с помощью фермента диаденилатциклазы, выделенной из созданного нами бактериального штамма-продуцента (рис. 2).

По нашему мнению, процедура внутриопухолевого введения двух новейших природных адьювантов, обладающих различным механизмом действия, будет представлять собой вакцинацию *in situ*, характеризующуюся универсальностью, безопасностью и доступностью для широкого круга пациентов.

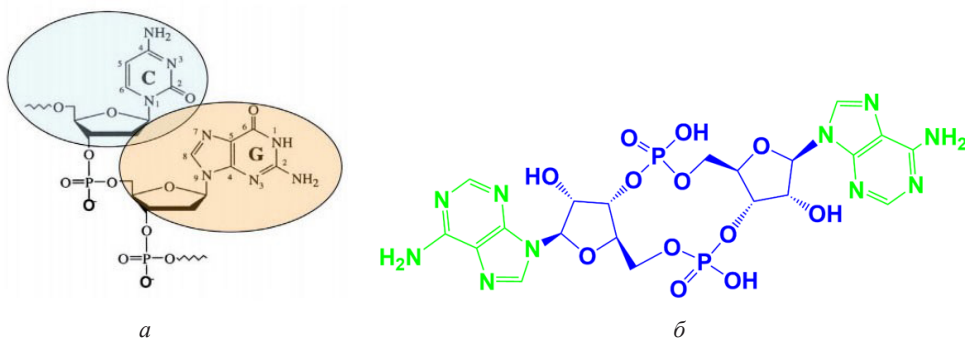


Рис. 2. Структурные формулы CpG-динуклеотида (а) и цикло-ди-АМФ (б)

Следует отметить, что противоопухолевую *in situ*-вакцинацию, по-видимому, можно проводить не только указанными выше адьювантами, но и другими иммуностимуляторами с различным (для синергизма) механизмом действия.

Список использованных источников

1. Атака на теломеры, или подход к терапии рака с помощью 6-тио-2'-дезоксигуанозина / А. Береснев [и др.] // Наука и инновации. – 2016. – № 9. – С. 58–61.
2. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine / I. Mender [et al.] // Cancer Discovery. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 82–95. doi: 10.1158/2159-8290.cd-14-0609
3. Enzymatic synthesis of 6-thio-2'-deoxyguanosine (6TDG) and its 5'-phosphatidyl derivative / L. Birycheuskaya [et al.] // Abstract of XXIV Int. Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. August 28–31, 2022. – Stockholm, Sweden. – P. 54.
4. Зинченко, А.И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А.И. Зинченко // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 118–128.
5. Булатовский, А.Б. Создание штамма – продуцента бактериальной нуклеозидфосфорилазы, слитой с человеческим аннексином А5 / А.Б. Булатовский, А.И. Зинченко // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 239–244.
6. Зинченко, А.И. К вопросу о создании персонализированной терапевтической противораковой вакцины / А.И. Зинченко, А.С. Щёколова, Л.Л. Биричевская // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 374–381.

Антибактериальная активность папаиновых гидролизатов пшеничной муки

Иванов О.А.¹, Василевская Е.Д.¹, Строгова А.А.¹, Шишло А.В.², Шевцов Н.А.¹

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Беларусь,

электронный адрес: prolife1984@gmail.com

²Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

При обсуждении проблематики применения антимикробных пептидов в качестве ветеринарных препаратов, средств защиты сельскохозяйственных культур, а также биоконсервантов одним из значимых вопросов является удешевление технологии получения препаративных форм и массовая доступность источников пептидов. В последние годы в качестве источников биоактивных пептидов, в том числе пептидов с антимикробной активностью, рассматриваются гидролизаты растительных белков, которые можно получить из культивируемых растений [1]. Распространенным способом получения таких пептидов является ферментативный гидролиз белковых изолятов или растительной муки при помощи протеаз, в результате чего образуются пептидные смеси, специфичность которых зависит от используемых протеаз [2].

В данном исследовании мы демонстрируем, что оптимальный выбор протеазы для ферментативного гидролиза белков пшеничной муки может вести к получению смеси пептидов, активных в отношении фитопатогенных и условно патогенных бактерий. В данном исследовании для анализа использовали пшеничную муку торговой марки «Лидская мука» производства «Лидахлебопродукт». Гидролиз образцов производился под действием папаина (Merck), трипсина, химотрипсина, пепсина (Sigma) и панкреатина-Белмед в концентрации 1 мг/мл, в буферных растворах с оптимальными значениями pH для каждого фермента. Время инкубации варьировалось от 2 до 24 ч при температуре 30 °С. Затем проводили термическую инактивацию ферментов и исследовали антимикробную активность исходных гидролизатов и пептидной фракции, содержащей пептиды с молекулярным весом ≤ 5 кДа, полученной при ультрафильтрации супернатантов на центрифужных концентраторах Spin-X UF 6 5000 MWCO (Corning). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. В качестве тест-культур были выбраны фитопатогенные бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae*, а также условно патогенные бактерии человека *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. Оценку антибактериальной активности (по диаметру зон ингибирования роста культур) гидролизатов проводили методом диффузии из лунок в агаризованную среду. Посев осуществляли из ночных культур бактерий (10^5 КОЕ/мл).

Установлено, что белковые гидролизаты, полученные при обработке пшеничной муки растворами трипсина, пепсина и панкреатина-Белмед, в течение 24 ч не проявляли антибактериальной активности. В свою очередь, папаиновые гидролизаты были активны в отношении всех бактерий. При этом, как видно из таблицы, сокращение времени гидролиза с 24 ч до 2 ч не влияло на антибактериальную активность, что свидетельствует о том, что пул антимикробных пептидов при папаиновом гидролизе формируется в полном объеме уже на сравнительно коротких временных отрезках.

Динамика ингибирования роста тест-культур гидролизатами белков пшеничной муки, полученными с использованием папаина

Тест-культура	Диаметр зон ингибирования, мм			
	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч
<i>Pseudomonas syringae</i>	20,5	19,5	20,5	–
<i>Xanthomonas campestris</i>	26,5	25,5	26,5	–
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	17,5	15,5	18,5	–
<i>Clavibacter michiganensis</i>	21	20	24	–
<i>Escherichia coli</i>	–	18	–	19
<i>Klebsiella</i> spp.	–	17	–	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	16,5	–	15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	16	–	18,5
<i>Enterococcus</i> spp.	–	18	–	17

Примечание. «–» – нет данных.

Полученная после ультрафильтрации пептидная фракция в концентрации 6 мкг подавляла рост *X. campestris* с зоной ингибирования 30 мм.

Таким образом, предварительно продемонстрировано, что ферментативный гидролиз пшеничной муки папаином приводит к формированию пула пептидов с антибактериальной активностью широкого спектра, и описанный процесс может быть эффективным способом получения смесей антимикробных пептидов для дальнейшего анализа.

Список использованных источников

1. Comparative evaluation of the antioxidant, antimicrobial and nutritive properties of gluten-free flours / J. Miedzianka [et al.] // Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11. – P. e.10385.
2. Antimicrobial plant-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis and fermentation as components to improve current food systems / F. Rivero-Pino [et al.] // Trends Food Sci. Tech. – 2023. – Vol. 135. – P. 32–42.

Оценка жизнеспособности планктонных бактерий при импульсном возбуждении в присутствии сенсibilизаторов

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н.

Оренбургский государственный университет,
Оренбург, Россия,
электронный адрес: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Широкое распространение микроорганизмов, устойчивых к действию традиционных антибиотиков, инициирует поиск альтернативных методов бактериальной инактивации. В настоящей работе оценивается вклад различных механизмов летального повреждения бактерий в суспензиях при импульсном лазерном возбуждении в присутствии фото- и термосенсibilизаторов.

Исследованы штаммы: *Salmonella typhimurium* LT2, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* IP 5332, *Pseudomonas aeruginosa* ATSS 27353. В качестве сенсibilизаторов использовались органические красители (эритрозин, родамин С) в концентрации 10^{-4} моль/л, а также наночастицы золота (6 нм). Оценивалось выживание микроорганизмов в бактериальных суспензиях после облучения YAG:Nd-лазером ($\lambda = 532$ нм, плотность мощности излучения, сфокусированного внутри суспензии $P = 0,1 \div 20$ МВт/см²). Пробы отбирались как из области фокусировки возбуждающего излучения, так и на расстоянии 5–10 мм от нее. Жизнеспособность бактерий из отобранных проб оценивалась путем подсчета КОЕ либо оценки оптической плотности питательной среды после 18 ч инкубации.

Установлено, что жизнеспособность облученных бактерий снижается в сравнении с контрольными группами (рис. 1, 2). С помощью атомно-силового микроскопа установлен характер изменения морфологии бактериальных клеток после облучения. Среди возможных механизмов инактивации бактерий при облучении растворов в присутствии сенсibilизаторов – фотодинамические реакции, гипертермия клеток, а также действие ударных волн [1–3]. Ударные волны возникают из-за локального нагрева среды при импульсном возбуждении сенсibilизаторов излучением мощностью 3–5 МВт/см². Снижение выживаемости бактерий под действием ударных волн наблюдалось не только в области фокусировки возбуждения, но и на удалении от нее (рис. 1, 2). При плотности мощности 15–20 МВт/см², частоте следования импульсов 10 Гц и времени облучения 30 с, в кювете объемом $5 \times 10 \times 20$ мм³ вообще не остается жизнеспособных бактерий. Фотодинамические реакции и гипертермия клеток эффективны при связывании сенсibilизатора с бактериальной клеткой. Поражение бактерий ударными волнами не зависит от взаимодействия сенсibilизаторов с клетками.

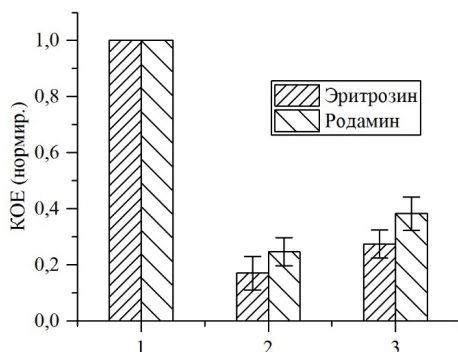


Рис. 1. КОЕ клеток *S. Typhimurium*, взятых из облученных суспензий с эритрозином и родамином С до и после облучения лазерными импульсами: 1 – контроль; 2 – зона облучения; 3 – расстояние 5 мм от зоны облучения

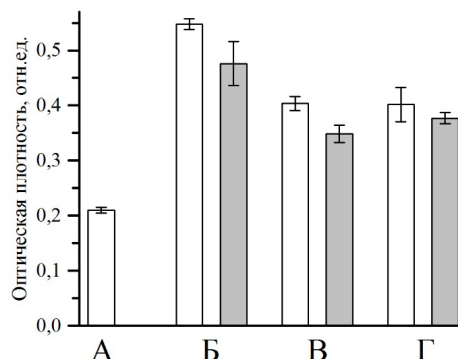


Рис. 2. Оптическая плотность образцов суспензии *S. epidermidis* (белый) и *P. aeruginosa* (серый) с наночастицами золота: А – оптическая плотность среды; Б – контрольный образец; В – образец из фокуса облучения; Г – образец на расстоянии 5 мм от зоны облучения

Таким образом, ударные волны, распространяясь в среде, могут уничтожать клетки не только в области возбуждения, но и на некотором удалении от нее. Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых методов инактивации бактерий.

Список использованных источников

1. Инактивация планктонных микроорганизмов ударными акустическими волнами / С.Н. Летута [и др.] // Журнал физической химии. – 2021. – Т. 95, № 4. – С. 646–654.
2. Mechanisms of damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon pulse photoexcitation of molecular sensitizers / S.N. Letuta [et al.] // Biophysics. – 2022. – Vol. 67, № 3. – P. 419–426.
3. Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections: efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives / Y. Feng [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – Vol. 177. – P. 113941.

Использование ПЦР для обнаружения хламидий и хламидияподобных микроорганизмов в респираторных образцах

Капустина Ю.М., Рубаник Л.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь,
электронный адрес: kapustinajm@gmail.com

Заболевания респираторного тракта (бронхит, внебольничная пневмония и др.) во всем мире являются наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью. Большое количество микроорганизмов, включая бактерии (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* и др.) и вирусы (гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус, коронавирус, риновирус и др.) являются широко распространенными и изученными патогенами респираторного тракта, лабораторная диагностика которых хорошо налажена. Однако, несмотря на это, в 20–30 %, а по мнению ряда авторов – в 50 % случаев респираторных заболеваний человека этиологическая причина остается неопределенной. В последние годы рядом исследователей установлен вклад атипичных возбудителей, таких как хламидияподобные микроорганизмы *Parachlamydia acanthamoebae* и *Simkania negevensis* в респираторную патологию человека [1–3]. Однако на сегодняшний день коммерческие диагностические наборы для молекулярно-биологической индикации этих патогенов недоступны. Соответственно, в Республике Беларусь не проводятся исследования по обнаружению этих хламидияподобных микроорганизмов и отсутствуют данные об их распространенности при респираторной патологии.

Ранее нами разработан, оптимизирован и успешно апробирован метод на основе ПЦР в режиме реального времени для индикации ДНК как хламидий, так и хламидияподобных микроорганизмов, основанный на амплификации специфичного для всех представителей порядка *Chlamydiales* фрагмента гена 16s рРНК. В качестве биологического материала для исследования использовали назофарингеальные мазки, образцы мокроты или бронхоальвеолярного лаважа от пациентов с клиническими диагнозами бронхит, внебольничная пневмония или острая респираторная инфекция в период январь 2022 – январь 2023 года.

С использованием разработанного метода проведено ПЦР исследование с целью оценки вклада как хламидий, так и хламидияподобных микроорганизмов в этиологическую структуру инфекционных заболеваний респираторного тракта. По результатам установлено отсутствие ДНК этих микроорганизмов

в 242 исследуемых образцах. Дополнительно проводилось тестирование на наличие в клиническом материале других респираторных патогенов. Определено, что этиологическим фактором респираторного заболевания в 6 случаях являлся грипп А(H1N1)pdm09, в 2 – грипп В, единичные случаи приходились на риновирус, SARS-CoV-2, метапневмовирус, парагрипп 1-го и 3-го типов, герпес 6-го типа, и в одном образце наблюдалась сочетанная инфекция метапневмовируса и герпеса 6 типа. По данным литературы, на долю *C. pneumoniae* – одного из атипичных бактериальных возбудителей респираторных заболеваний, относящихся к порядку *Chlamydiales*, приходится от 2 до 20 % случаев внебольничных пневмоний. В то же время, вклад хламидияподобных микроорганизмов – *P. acanthamoebae* и *S. negevensis* в респираторную патологию, по данным разных авторов, может составлять 5–10 % [1–3]. Полученные данные могут свидетельствовать о низкой интенсивности циркуляции данных возбудителей. На это также влияет объем выборки и анализируемый временной период.

Проведено исследование сопоставимости получаемых результатов для выявления хламидий. Молекулярно-генетический анализ 200 биологических образцов был осуществлен с использованием трех коммерческих тест-систем («ПНЕВМОПОЛ-Хл» ООО НПФ «Литех», РФ; «АртТест Хламидия» (*C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. suis*, *C. pecorum*) и «АртТест Хламидия» (*C. psittaci*) ООО «АртБиоТех», РБ) и разработанного метода на основе ПЦР в режиме реального времени. Была показана полная сопоставимость результатов для каждого из протестированных образцов. Следует отметить, что существенным отличием разработанного метода является способность детектировать не только хламидии (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и др.), но и хламидияподобные микроорганизмы (*P. acanthamoebae*, *S. negevensis*, *W. chondrophila* и др.) за счет детекции специфичного фрагмента гена 16S рРНК. Это обеспечит индикацию большего количества возможных патогенов респираторного тракта, относящихся к порядку *Chlamydiales*, и позволит в целом увеличить эффективность этиологической расшифровки случаев респираторных заболеваний.

Список использованных источников

1. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples / J. Lienard [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, № 7. – P. 2637–2642.
2. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae* / A. Taylor-Brown [et al.] // Pathog. Dis. – 2015. – Vol. 73, № 1. – P. 1–15.
3. Vouga, M. *Simkania negevensis*, an insight into the biology and clinical importance of a novel member of the *Chlamydiales* order / M. Vouga, D. Baud, G. Greub // Crit. Rev. Microbiol. – 2017. – Vol. 43, № 1. – P. 62–80.
4. Рачина, С.А. Атипичные возбудители внебольничной пневмонии: от эпидемиологии к особенностям диагностики и лечения / С.А. Рачина, А.А. Бобылев // Практическая пульмонология. – 2016. – № 2. – С. 20–27.

Биотехнологические способы повышения экстрактивности чая

Крестина Е.А., Алексаночкин Д.И., Фоменко И.А., Шаненко Е.Ф.

*ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ),
Москва, Россия,
электронный адрес: fomenkoia@mgipp.ru*

Чай играет огромную роль в жизни человека. Он имеет широкую область применения: в медицине (получение кофеина, витамина Р), кулинарии (в качестве приправы), пищевой (для изготовления красителя) и косметической промышленности (чайный экстракт входит в состав кремов с SPF). Помимо этого, существует еще множество нетрадиционных способов его применения.

Для сохранения или улучшения органолептических и физико-химических показателей чая прибегают к методам биотехнологии. На протяжении многих лет обработка чайных листьев основывалась на действии их собственных (эндогенных) ферментов, но этот процесс достаточно непростой, поскольку их действие очень сложно контролировать. Еще одним недостатком является то, что все ферменты обладают различной активностью, поэтому при производстве чая все чаще прибегают к применению экзогенных ферментов.

Так, например, при обработке чая танназой улучшается его экстрактивность (он способен завариться даже в холодной воде), его прозрачность, а также уменьшается образование чайной пены [1]. Показано ее влияние и на органолептические показатели: усиливается сладкое послевкусие и становится менее выявленным горький и вяжущий вкус настоя [2]. Широкое применение в чайной промышленности нашли такие ферменты, как целлюлаза, пектиназа и мультиэнзимные композиции (МЭК) на их основе. При обработке листьев МЭК скорость экстракции зеленого чая увеличивалась до 76 %, черного – до 72 %, а при использовании одного фермента такого результата не наблюдается [3]. Чтобы улучшить аромат чайного напитка прибегают к действию β -глюкозидазы. Этот фермент способствует проявлению цветочных, фруктовых и травяных ноток, ослаблению карамельного привкуса (за счет изменения состава летучих соединений) [3].

Изучив действие каждого отдельного фермента, а также их комбинации на чай, возможно выбрать наиболее подходящий состав и на его основе разработать собственную или усовершенствовать исходную рецептуру чайных напитков. За счет этого можно добиться улучшения растворимости чая, т.е. настой будет более концентрированным, усовершенствовать его окислительно-восстановительный потенциал, органолептические характеристики, содержание фенольных соединений и другие показатели.

Спісок іспользаваных істочнікаў

1. High level expression and characterization of tannase tan 7 using *A.Niger* SH-2 with low-background endogenous secretory proteins as the host / F. Liu [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2018. – Vol. 144. – P. 71–75.
2. Improving the sweet aftertaste of green tea infusion with tannase / Y. Zhang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 192. – P. 470–476.
3. Extraction and preparation of high-aroma and low-caffeine instant green teas by the novel column chromatographic extraction method with gradient elution / Q. Li [et al.] // *Journal of Food Science & Technology*. – 2017. – Vol. 54, № 7 – P. 470–476.

Возможности генерации зрелых дендритных клеток с применением иммуномодулятора бактериального происхождения

Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Годовалов А.П.

*Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия,
электронный адрес: lebedinska@mail.ru*

В последние годы в литературе появляются сообщения об использовании иммунной распознающей системы для развития новых подходов иммунотерапии инфекционных и онкологических заболеваний. Дендритные клетки (ДК) – ключевой тип клеток на всех этапах реализации эффекторных функций иммунитета, обладающий мощным потенциалом по сравнению с другими антигенпрезентирующими клетками, которые способны распознавать патоген и управлять адаптивной иммунной системой [1]. Способность ДК эффективно представлять антиген Т-лимфоцитам активно используется для генерации специфических иммунных клеток-эффекторов и для создания противоиных и противоопухолевых вакцин.

Цель исследования – изучение возможности генерации зрелых ДК на основе незрелых, полученных из клеток-предшественников костного мозга мышей с применением липополисахаридных бактериальных комплексов.

В эксперименте использованы самцы мышей линии СВА массой 10–20 г, полученные из питомника лабораторных животных «Крюково» (30 животных). Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (США), трижды осаждали центрифугированием и переводили в полную культуральную среду (ПКС). Для получения незрелых ДК к суспензии выделенных клеток в концентрации $1 \cdot 10^6$ в 1 мл ПКС добавляли по 10 нг/мл мышинных рекомбинантных GM-CSF и IL-4. На 3-и сут повторно добавляли те же цитокины. На 6-е сут производили смену среды с добавлением или TNF- α (100 нг/мл), или ЛПС *Klebsiella pneumoniae* (0,125 мкг/мл) для индукции созревания ДК, и на 9-е сут собирали полученные клетки для морфологического и иммунофенотипического анализа.

Дендритные клетки, обладающие фенотипическими признаками незрелых ДК – низким уровнем экспрессии костимулирующих и МНС молекул – были получены из предшественников костного мозга в результате инкубации с GM-CSF и IL-4. Использование ЛПС *K. pneumoniae* и TNF- α в качестве индукторов созревания позволило генерировать зрелые ДК, характеризующиеся типичной морфологией и фенотипом CD38⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺, МНС II⁺, F4/80^{low} [2]. При добавлении к культуре ДК TNF- α уровень CD86 увеличивал-

ся в 11,5 раз, а ЛПС *K. pneumoniae* повышали его экспрессию почти в 12 раз. Количество зрелых клеток, экспрессирующих молекулы CD80, увеличивалось в 8,4 раза по сравнению с незрелыми в случае введения TNF- α и в 9 раз – ЛПС *K. pneumoniae*. Дендритные клетки, полученные из предшественников костного мозга мышей, обладали способностью усиливать бласттрансформацию сингенных МЛ. Спонтанная пролиферативная активность МЛ в условиях данного опыта составляла $0,650 \pm 0,073$ у. е. При культивировании МЛ в присутствии зрелых ДК, обработанных ЛПС *K. pneumoniae* и TNF- α , отмечалось повышение пролиферативной активности мононуклеаров, причем все исследуемые препараты усиливали активность ДК практически в равной степени. Незрелые ДК не оказывали заметного влияния на пролиферацию МЛ.

Исследования бласттрансформации МЛ селезенки мышей под влиянием ДК показали, что бактериальные ЛПС, используемые для индукции созревания ДК, как и TNF- α , в значительной степени повышают пролиферативную активность мононуклеаров. Исследуемые препараты, индуцируя созревание ДК, усиливают их антигенпрезентирующую способность и возможность стимулировать пролиферацию МЛ. Полученные результаты позволяют сделать выводы о том, что ДК не только обладают высокой способностью презентировать Т-киллерам специфические антигены и премировать их по отношению к микробам и опухолевым клеткам, но и играют ключевую роль в реакциях межклеточного взаимодействия при формировании неспецифического иммунного ответа.

Таким образом, в наших исследованиях продемонстрирована возможность получения зрелых ДК из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индукторов созревания ДК не только TNF- α , но и бактериальных ЛПС.

Список использованных источников

1. Киселевский, М.В. Адоптивная иммунотерапия злокачественных новообразований с использованием лимфокин-активированных киллеров и дендритных клеток / М.В. Киселевский, О.В. Лебединская // Перм. мед. журн. – 2004. – № 3. – С. 116–127.
2. Лебединская, О.В. Сравнительная характеристика морфологических и иммунофенотипических особенностей дендритных клеток, генерированных из клеток-предшественников костного мозга и эмбриональной печени мышей / О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, В.М. Киселевский // Материалы Всерос. науч. конф. «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины». – Пермь : ГОУ ВПО ПГМА Росздрава, 2005. – С. 19–24.

Глицеролселективные ферменты для детекции глицерола

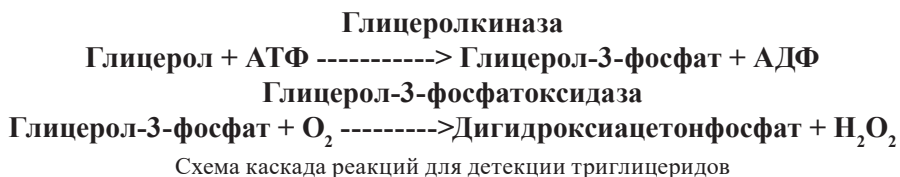
Левчук О.Д.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: demeshkoo@mail.ru*

Важной задачей аналитической биотехнологии является определение концентрации глицерола. Это связано с использованием данного соединения в различных отраслях промышленности. Глицерол – один из метаболитов спиртового брожения, определяющий вкусовые качества напитков и пищевых продуктов [1]. Его используют при производстве взрывчатых веществ, косметических средств, лекарственных препаратов. С необходимостью детекции глицерола и триглицеридов в крови человека связано выявление патологий липидного обмена, как приводящих к различным заболеваниям, так и осложняющих течение уже имеющихся [1].

Цель работы – подбор оптимальных условий проведения сопряженной реакции энзиматической трансформации глицерола.

Энзиматическое определение глицерола основано на каскаде реакций (см. рисунок).



Нами ранее получен штаммы-продуценты глицеролкиназы (ГК, КФ 2.7.1.30) – фермент класса трансфераз, семейства фосфотрансфераз, который катализирует перенос фосфатной группы от аденозинтрифосфата (АТФ) на молекулу глицерола с получением глицерол-3-фосфата и аденозиндифосфата [2], а также штамм-продуцент глицерол-3-фосфатоксидазы (ГТФОх, КФ 1.1.3.21) – ФАД–зависимая оксидоредуктаза, которая в реакции, сопряженной с глицеролкиназой, катализирует окисление глицерол-3-фосфата до гидроксиацетонфосфата и пероксида водорода [3].

Для постановки сопряженной реакции наработаны лабораторные образцы ГК и ГТФОх. Для подбора условий сопряженной реакции окисления глицерола использовали концентрат ГК в количестве 30 и 50 мкл. Пробы выдерживали при температуре 37 °С в течение 30 мин. Продукт реакции фосфорилирования глицерола ГК анализировали с использованием тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинах («Merck», Германия) в системе растворителей

диоксан–25 %-ный водный аммиак–вода (9:1:6). Полученную реакционную смесь использовали в качестве субстрата для детекции активности ГТФОх, которая составила 18,8 и 20,2 ед/мл, соответственно.

На заключительном этапе проводили сопряженную реакцию окисления глицерола с участием ГК и ГТФОх. Реакционная смесь для постановки сопряженной реакции содержала 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,0), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ АТФ, 10 % глицерин, 0,1 % бензохинон, ГК и ГТФОх (по 50 мкл). Реакцию проводили при 30 и 37 °С. Кинетику ферментативных реакций регистрировали при $\lambda = 290$ нм.

Показано, что при 37 °С через 10 мин после начала реакции в течение последующих 3 мин наблюдалось экспоненциальное увеличение оптической плотности, что свидетельствует об участии данных ферментов в сопряженной реакции преобразования глицерола.

Полученные результаты в дальнейшем будут использованы для определения оптимальных составов ферментов в наборах для определения глицерола.

Список использованных источников

1. Glycerine: an overview // SCRIBD [Electronic resource]. – 1990. – Mode of access: <https://www.scribd.com/doc/77393203/Glycerine-An-Overview>. – Date of access: 15.03.22.
2. Получение штамма *Escherichia coli* – продуцента гомологичной глицеролкиназы / О.Д. Демешко [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2019. – Т. 11. – С. 81–92.
3. Получение штамма *Escherichia coli* – продуцента гетерологичной глицерол-3-фосфатоксидазы / О.Д. Демешко [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – Минск : Беларус. навука, 2020. – Т. 12. – С. 80–89.

Рекомбинантные моноклональные антитела, полученные методом фагового дисплея, угнетают синтез коллагена нормальными фибробластами человека

Павлова Е.В.¹, Соляникова И.П.²

¹Центральный исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия, электронный адрес: ev.pavlova@cmd.su

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ ПНЦБ РАН, Пущино, Россия,

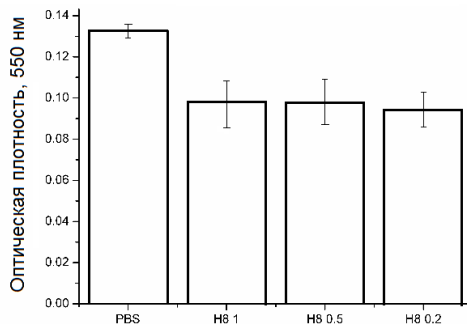
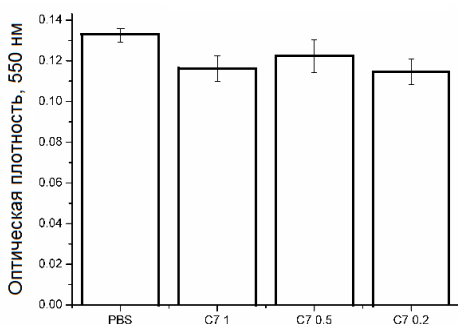
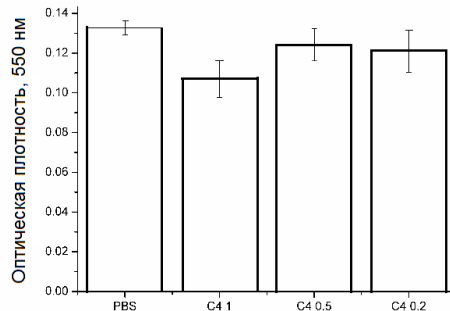
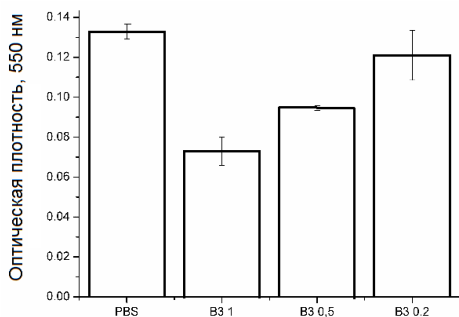
Галектин-3 (Gal-3) – белок из семейства галектинов, представляющий большой исследовательский интерес. Он участвует в развитии ряда заболеваний, таких как рак, фиброз и сердечная недостаточность, что делает его перспективным с точки зрения диагностики и терапии этих заболеваний. Gal-3 действует на клетку, связываясь с рецепторами внутри клетки или на ее поверхности. Так, добавленный к прикрепленной культуре нормальных фибробластов человека, Gal-3 стимулировал синтез ДНК и индуцировал пролиферацию [2]. Целью данного исследования стала оценка эффективности синтеза коллагена в присутствии антител к Gal-3.

Ранее методом фагового дисплея были получены четыре рекомбинантных моноклональных антитела против Gal-3 [3]. Нормальные фибробласты человека любезно предоставил Р.С. Фадеев (лаборатория строения и функций мышечных белков Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино). Для работы брали антитела в трех концентрациях: 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,2 мкМ. Время инкубации фибробластов с антителами к Gal-3 в питательной среде ДМЕМ составило три недели. В качестве отрицательного контроля вместо антител использовали эквивалентный объем PBS. Рекомбинантный Gal-3 в среду не добавляли, так как он содержится в самих фибробластах [4].

Фибробласты обрабатывали красителем, специфичным к коллагену (Sirius Red) и растворяли щелочью для определения оптической плотности на спектрофотометре Infinite F200 (Швейцария). Каждое измерение проводилось в шести повторях. Среднее, стандартное отклонение и доверительный интервал рассчитывали при уровне значимости менее 0,05. Результаты представлены на рисунке.

Антитела С4 и С7 не оказывали статистически достоверного снижения синтеза коллагена. Антитело В3 вызвало дозо-зависимый эффект. Количество коллагена снизилось на 50 % при концентрации антитела 1 мкМ. Антитело Н8 статистически значимо уменьшило экспрессию коллагена фибробластами, однако его эффект не зависел от дозы. Отсутствие дозозависимости может объясняться тем, что аффинность антитела Н8 к Gal-3 является наиболее высокой

среди всех исследованных антител, и, возможно, диапазон его эффективности лежит ниже порога исследованных концентраций.



Экспрессия коллагена фибробластами человека в присутствии антител, специфичных к Gal-3

Снижение синтеза коллагена фибробластами в присутствии антител, специфичных к Gal-3, позволяет оптимистично оценивать перспективы разработки на их основе терапевтического кандидата для лечения заболеваний, связанных с фибротизацией внутренних органов.

Список использованных источников

1. Dunic, J. Galectin-3: an open-ended story / J. Dunic, S. Dabelic, M. Flogel // *Biochemica and biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1760. – P. 616–635.
2. Inohara, H. Galectin-3 stimulates cell proliferation / H. Inohara, S. Akahani, A. Raz // *Exp. Cell Res.* – 1998. – Vol. 245. – P. 294–302.
3. Development and functional characterization of human antibodies against Galectin-3 / E.V. Pavlova [et al.] // *Internat. J. of Biology and Biomed. Engineering*. – 2019. – Vol. 13. – P. 167–172.
4. Identification of carbohydrate-binding proteins from mouse and human fibroblasts / C.F. Roff [et al.] // *Biochem J.* – 1983. – Vol. 211. – P. 625–629.

Технология получения экстракта из биомассы хлореллы, культивируемой в условиях *in vitro*

Павлюченко И.В., Фоменко И.А.

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ),
Москва, Россия,
электронный адрес: fomenkoia@mgupp.ru

В последние десятилетия микроводоросли приобрели популярность благодаря спросу на натуральную и экологически чистую продукцию. Они потребляют атмосферный углекислый газ и выделяют кислород.

Chlorella vulgaris – яркий представитель одноклеточных водорослей. Она отличается безопасностью, простотой строения клетки, высокой скоростью размножения, пластичностью метаболизма, благодаря которому можно изменять биохимический состав клетки. *Chlorella* содержит большое количество белка (около 50 % от массы СВ), липиды, а также некоторые коммерчески значимые БАВ: пигменты (каротиноиды, хлорофилл), жирные кислоты (Омега-6), витамины, антиоксиданты, антибиотики и др. [1] и обладает антиоксидантной, антибактериальной и противовоспалительной активностью. Благодаря положительному влиянию на организм человека и животных, хлорелла нашла применение в сельском хозяйстве и аквакультуре, в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

На рост хлореллы и накопление ценных соединений влияют следующие факторы: состав питательной среды, pH, температура, концентрация растворенного CO₂, интенсивность освещения. Культивирование *in vitro* позволяет контролировать данные параметры, а подбор оптимальных условий роста дает возможность увеличивать выход биомассы и регулировать синтез различных соединений.

Одной из главных проблем микроводорослей является жесткая клеточная стенка, которая снижает усвоение ценных питательных веществ. Решение проблемы возможно с помощью подбора эффективного метода экстракции, которая зависит от ряда параметров: тип экстрагента, гидромодуль (соотношение сырье : экстрагент), продолжительность и температура экстракции [2]. Было показано, что полученные методом мацерации при 40 °С водные экстракты хлореллы характеризуются высоким содержанием экстрактивных веществ (39,7 %), низким содержанием пигментов (0,19 %) и флавоноидов (0,01 %) [3]. При использовании этилового спирта в качестве экстрагента с увеличением его концентрации с 30 до 95 % снижается концентрация экстрактивных веществ, а концентрация пигментов и флавоноидов увеличивается. Использование водного раствора глицерина также показывает положительные результаты [2].

Применение других растворителей (гексан, хлороформ, метанол, ацетон и др.) ограничено из-за их токсичности.

Мацерация и экстракция по Сокслету – традиционные методы экстракции. В настоящее время применяют также экстракцию с помощью микроволн или ультразвука, жидкостную экстракцию под давлением, экстракцию импульсным электрическим полем, сверхкритическую флюидную экстракцию, однако некоторые из приведенных методов трудоемки и имеют высокую стоимость.

Часто перед экстракцией используют предварительную обработку физическими (варка, сушка, осмотический шок, замораживание – оттаивание, криогенное измельчение) химическими (кислота, основание, поверхностно-активные вещества) или ферментативными (целлюлаза, протеаза) методами, что также позволяет увеличить выход ценных веществ [4].

Список использованных источников

1. Comprehensive GCMS and LC-MS/MS Metabolite Profiling of *Chlorella vulgaris* / Н.А. Pantami [et al.] // *Marine Drugs*. – 2020. – Vol. 18, № 7.
2. Бутова, С.Н. Получение экстрактов косметического назначения из микроводоросли *Chlorella vulgaris* / С.Н. Бутова, И.Д. Щеголева, К.А. Тхоржевская // *ХИПС*. – 2018. – № 3. – С. 20–26.
3. Выбор экстрагента для получения извлечений из биомассы хлореллы с высоким содержанием биологически активных соединений / Н.В. Митишева [и др.] // *Междунар. науч.-исслед. журн.* – 2022. – № 10.
4. Saini, R.K. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments / R.K. Saini, Y.S. Keum // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 240. – P. 90–103.

Разработка ферментной технологии получения кератина разной степени гидролиза из отходов птицеводства

Попович С.А., Бунеева Е.А., Лепехина О.В., Рябова А.С., Арзуманова А.Р., Толкачева А.А., Черенков Д.А.

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия,
электронный адрес: sergey.popovich2001@gmail.com*

Кератин – это структурный белок, который обладает высокой прочностью, входит в состав кожи и выступает строительным веществом для ее производных. Кератин широко используется в косметологии и медицине, поскольку помогает защитить структуры кожи от повреждений и может быть частью процесса заживления. Традиционно кератин для коммерческого использования получают химическим гидролизом из животного сырья (копыт, шерсти и перьев). Однако недостатками существующих химических технологий являются сложность получения кератина заданной молекулярной массы, а также неспецифичность действия щелочи на его химические связи, не позволяющая получить фракции стабильного и прогнозируемого состава. Наиболее перспективным способом получения качественного кератина с заданными свойствами является использование технологии ферментативного гидролиза с применением специфичного фермента (кератиназы).

Нами разработана генетическая конструкция для получения рекомбинантной кератиназы *B. licheniformis* в клетках *E. coli*. В рамках разработки технологии ферментативного гидролиза были получены модельные растворы кератина разной степени гидролиза из пера птицы с помощью щелочного гидролиза. Проанализирован состав фракций кератина с использованием гель-электрофореза. Определен его аминокислотный состав методом ВЭЖХ, структура полученного кератина – ИК-спектроскопией. Дальнейший сравнительный анализ ферментативной и химической методики получения кератина позволит разработать технологию получения фракций кератина с заданными и стабильными характеристиками.

Скрининг молочнокислых бактерий – продуцентов биосурфактантов

Саидова И.М., Маматраимова Ш.М., Алимова Б.Х., Пулатова О.М.,
Махсумханов А.А.

*Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: irodamirolimova@gmail.com*

Биосурфактанты (БС) представляют собой структурно разнообразную группу поверхностно-активных биомолекул, синтезируемых микроорганизмами. Молочнокислые бактерии (МКБ) представляют собой важную группу микроорганизмов, синтезирующих БС. Применение БС синтезируемых штаммами МКБ перспективно, поскольку эти микроорганизмы являются природными обитателями микрофлоры человека и хорошо известны своими пробиотическими свойствами. Они представляют собой большой практический интерес, поскольку относятся к категории GRAS и уже используются во многих фармацевтических и пищевых производствах [1].

МКБ были выделены из различных природных источников. С использованием качественных и количественных методов анализа проведен скрининг МКБ на биосинтез БС. Как показали результаты исследований, максимальный индекс эмульгирования (60 %) наблюдался для штаммов *Limosilactobacillus fermentum Q1*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii D*, *Lactobacillus acidophilus D*, *Bifidobacterium bifidum 1*, *Bifidobacterium animalis 1* и *Leuconostoc mesenteroides Q1*. Следует отметить, что из 24 культур, только у 6 штаммов (*Lactobacillus plantarum KA*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii D*, *Lactobacillus acidophilus 2*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus Tr*, *Enterococcus faecium R3* и *Leuconostoc mesenteroides Q1*) наблюдался биосинтез БС в культуральную жидкость с В” с ИЭ более 50 % (рис. 1).

При качественном скрининге 50 штаммов с использованием тестов на вытеснение нефти у 5 штаммов зона вытеснения нефти варьировала от 5 до 20 мм, максимальная зона вытеснения нефти наблюдалась для штаммов *Leuconostoc mesenteroides Q1* и *Enterococcus faecium R3* и составила 20 и 18 мм соответственно (рис. 2).

Штаммы не обладали способностью вызывать гемолиз на среде с кровяным агаром, однако при использовании других методов скрининга дали положительный результат.

Таким образом, в результате первичного скрининга по признаку биосинтеза БС отобрано 8 штаммов МКБ. При экстракции БС из супернатанта культуральной жидкости штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii D* и *Lactobacillus acidophilus D* выход составил 1,2 и 1,5 г/л соответ-

ственно, тогда как после экстракции внутриклеточных БС штамма *Leuconostoc mesenteroides* Q1 – 2,21 г/л. Выделенные активные штаммы МКБ – продуценты БС представляют биотехнологический интерес с перспективой применения их в медицине, фармацевтике и пищевой промышленности.

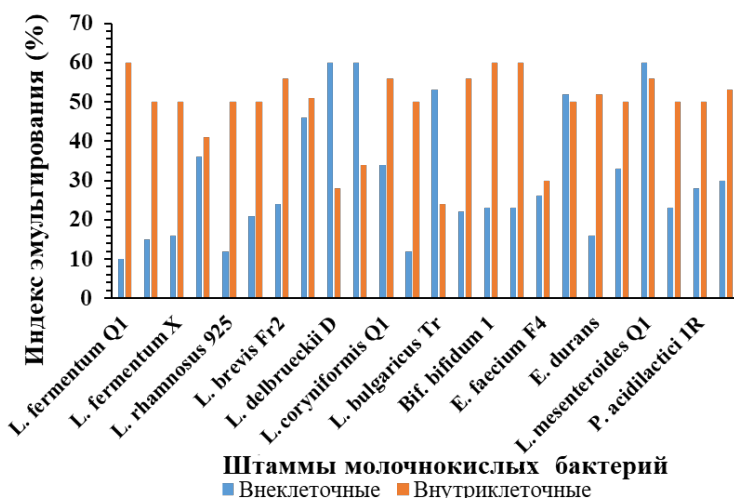


Рис. 1. Скрининг штаммов МКБ по индексу эмульгирования



Рис. 2. Скрининг МКБ по анализу вытеснения нефти

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Recent Trends on Biosurfactants with Antimicrobial Activity Produced by Bacteria Associated with Human Health: Different Perspectives on Their Properties, Challenges, and Potential Applications / A. De Giani [et al.] // Antimicrobial Biosurfactants by Human Health Associated. Bacteria. – 2021. – Vol. 12. – P. 225. doi: 10.3389/fmicb.2021.655150
2. Bjerk. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery / R.B. Thiago [et al.] // Biotechnology & Ecotoxicology Bioengineering. – 2021. – Vol. 8. – P. 115. doi: org/10.3390/bioengineering8080115

Ферментативный гидролиз кека спиртовой барды

Сапунова Л.И., Шепшелев А.А., Мартынова Е.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: leonida@mbio.bas-net.by*

Растущий мировой спрос на этанол предполагает постоянное увеличение его производства, а также необходимость утилизации возрастающих объемов образующегося отхода – спиртовой барды. Зерновое сырье, физиолого-биохимические особенности микроорганизмов – продуцентов спирта, технологический процесс и его аппаратное оснащение влияют на содержание в барде белков, углеводов, клетчатки, минеральных веществ, определяющих ее фактическую питательную ценность. Поэтому концентрирование и сушка является наиболее распространенным промышленным способом утилизации цельной спиртовой барды с содержащимися в ней растворимыми веществами. Получаемый продукт, известный как DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles), традиционно применяют в рационах жвачных животных и ограничено из-за высокого содержания клетчатки – в кормах для животных с однокамерным желудком (свиней и птицы) и аквакультуры [1].

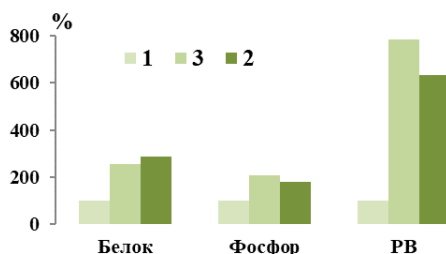
Принимая во внимание, что спиртовая барда является относительно новым возобновляемым сырьем, исследованию технологических и экономических аспектов ее переработки в продукцию высокой добавленной стоимости уделяется пристальное внимание. Ожидается, что эффективность использования спиртовой барды повысится за счет потенциальной востребованности получаемых из нее продуктов в сельском хозяйстве, медицине, пищевой, микробиологической, биотопливной промышленности и др. [1, 2]. В последние годы акцент сделан на глубокую переработку спиртовой барды посредством ее микробной и/или энзиматической трансформации [2–6].

Цель настоящего исследования – оценка влияния комплекса ферментов, гидролизующих трудно перевариваемые полимеры кека спиртовой барды, на выход свободных редуцирующих веществ, белка и фосфора.

В работе использовали кек спиртовой барды с исходной влажностью 70,29 %. Ферментативную обработку субстрата проводили смесью взятых в равных пропорциях коммерческих препаратов в количестве 0,1 и 1,0 % к массе кека. Условия ферментации: температура – 40 °С, интенсивность постоянного перемешивания – 200 об/мин, длительность – 24 ч.

Ферментный комплекс препарата «Вискозим Вит НТ FG» (Симбио, Россия) представлен α -амилазой, ксиланазой, β -глюканазой и целлюлазой; Vakezyme P500B6 (DKSH, Новая Зеландия) – α -амилазой грибного происхождения; Акстра РНУ 10 000 ТРТ2 (Лакруа, Беларусь) – фитазой.

Определение содержания в нативном и ферментированном кеке спиртовой барды влаги, редуцирующих веществ, белка и неорганического фосфора проводили общепринятыми методами. Результаты представлены средним значением данных, полученных в двух независимых экспериментах (см. рисунок).



Влияние комплексной ферментативной обработки кека спиртовой барды на содержание растворимого белка, фосфора и редуцирующих веществ: кек спиртовой барды нативный (1) и обработанный ферментами в концентрации 0,1 (2) и 1,0 мас.% (3)

Анализ экспериментальных данных указывает на существенное повышение в ферментированном продукте всех исследуемых питательных веществ: растворимого белка – в 2,55–2,88 раза, фосфора – в 1,79–2,06 раза, редуцирующих веществ – в 7,86 раза. Следует, однако, подчеркнуть, что в неоптимизированных условиях опыта десятикратное повышение концентрации биокатализаторов (с 0,1 до 1,0 %) не приводило к адекватному повышению эффективности их действия. По-видимому, минимальная (0,1 %) концентрация используемых ферментных препаратов оказалась достаточной для глубокого гидролиза клетчатки и фитата спиртовой барды. Для повышения эффективности обработки, очевидно, дополнительно потребуются ферменты, разрушающие лигноцеллюлозную составляющую барды. Несмотря на необходимость дальнейшей оптимизации процесса энзиматической ферментации, полученные результаты уже сейчас указывают на существенное повышение питательной ценности и усвояемости кека спиртовой барды.

Список использованных источников

1. Utilization of Distiller's dried grains with solubles: A review / R. M E. Buenavista [et al.] // J. Agr. Food Res. – 2021. – Vol. 5. – P. 100-195. doi: 10.1016/j.jafr.2021.100-195
2. Iram, A. Distillers' dried grains with solubles (DDGS) and its potential as fermentation feedstock / A. Iram, D. Cekmecelioglu, A. Demirci // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2020. – Vol. 104, № 14. – P. 6115–6128.
3. Bals, B. Enzymatic hydrolysis of distiller's dry grain and solubles (DDGS) using ammonia fiber expansion pretreatment / B. Bals, B. Dale, V. Balan // Energy Fuels. – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 2732–2736.
4. Nghiem, N.P. Pre-treatment of dried distiller grains with solubles by soaking in aqueous ammonia and subsequent enzymatic/dilute acid hydrolysis to produce fermentable sugars / N. P. Nghiem, J. Montanti, T. H. Kim // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2016. – Vol. 179. – P. 237–250.

5. Enzymatic hydrolysis of various pretreated dried distillers' grains with solubles / E. L. Baldwin [et al.] // Adv. Ind. Biotechnol. – 2018. – Vol. 1. – P. 004. doi: 10.24966/AIB-5665/100 004

6. Jerez-Bogota, K. Optimization of conditions for heat pretreatment and enzymatic predigestion of DDGS for pigs [Electronic resource] / K. Jerez-Bogota // South Dakota State University, 2020. – Mode of access: <https://openprairie.sdstate.edu/etd/3947>. – Date of access: 15.03.2023.

Разработка напитков профилактического назначения, обогащенных пробиотиками, пребиотиками, витаминами и минералами

Сармурзина З.С.¹, Абитаева Г.К.¹, Бисенова Г.Н.¹, Мусабаева Б.К.¹,
Найманов Е.Н.²

¹Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан,
электронный адрес: *sarmurzina@list.ru*

²Молочный завод «Астана-Өнім», Красноярка, Казахстан

Пищевая промышленность является одной из стратегических отраслей и играет важнейшую роль в экономике, продовольственной безопасности и общественном здравоохранении [1].

Разработка пробиотических рецептур пищевых продуктов является ключевым направлением исследований для будущего рынка функциональных продуктов питания. Экономические прогнозы ожидают, что мировой рынок пробиотических пищевых добавок увеличится с 3,3 до 7 млрд долл. США в период с 2015 по 2025 год [2].

Кисломолочные продукты играют важную роль в питании людей: улучшают обмен веществ, стимулируют секрецию желудочной кислоты, наличие в их составе микроорганизмов, способных оседать в кишечнике и подавлять гнилостную микрофлору, приводит к торможению гнилостных процессов и прекращению образования токсичных продуктов расщепления белков, поступающих в кровь человека [3].

Целью работы являлась разработка технологии приготовления напитков профилактического назначения с добавлением пробиотических молочнокислых бактерий, витаминов, минералов и пребиотиков.

В процессе работы разработаны рецептуры профилактических напитков:

1) профилактический напиток № 1 на основе молока натурального, консорциума молочнокислых пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* 1А, *L. paracasei* 2А, *L. brevis* 4 LB, пребиотика инулина, витаминов (А, С) и минерала (йодид калия);

2) профилактический напиток № 2 на основе молочной сыворотки, консорциума молочнокислых пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* 1А, *L. paracasei* 2А, *L. brevis* 4 LB, пребиотика инулина, витаминов (А, С) и минерала (йодид калия).

Изучены физико-химические свойства профилактических напитков № 1 и № 2 (см. таблицу). Согласно полученным данным, основные физико-химические показатели профилактических напитков № 1 и № 2 соответствуют нормативному документу СТ РК 1733-2015 на вид продукта «Кисломолочные

продукты, кроме йогурта, сметаны, творога, в том числе продукты с бифидобактериями и другими пробиотическими микроорганизмами».

Физико-химические свойства профилактических напитков № 1 и № 2

Показатель	Результаты исследования ПН № 1	Результаты исследования ПН № 2	Основные показатели согласно нормативной документации	Нормативная документация на методы испытаний
Массовая доля жира, %, не менее	3,74	1,39	0,1–9,9	СТ РК 1733
Массовая доля СОМО, %, не менее	8,37	9,57	Не менее 7,8	СТ РК 1733
Кислотность, °Т	70,0	80	70–140	СТ РК 1733
Плотность, кг/м ³	1,02 849	1,03 508	–	СТ РК 1733
Массовая доля белка, %	3,18	3,65	2,6–4,0	СТ РК 1733
Массовая доля лактозы, %	4,46	5,13	–	СТ РК 1733
Массовая доля солей, %	0,71	0,80	–	СТ РК 1733
Точка замерзания, °С	0,522	0,59	–	СТ РК 1733
Массовая доля воды, %	0,0	0,0	–	СТ РК 1733
Проводимость (Ms/cm) (Фальсификация)	5,78	9,09	–	СТ РК 1733
Температура пробы, °С	24,63	22,73	–	СТ РК 1733

Настоящее исследование профинансировано Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (№ BR10 764 998).

Список использованных источников

1. Bagheri, R. Identifying and ranking key technological capabilities in supply chain sustainability using ISM approach: case of food industry in Iran / R. Bagheri, P. Zomorodi, A. Rezaeian // *Environment, Development and Sustainability*. – 2023. – 14 March. – doi: org/10.1007/s10668-023-03091-6
2. Functional products fortified with probiotic LAB isolated from Egyptian dairy sources showed hypolipidemic effects in Albino rats / A.M.G. Darwish [et al.] // *PLoS ONE*. – 2022. – Vol. 17 (3). – P. e0263241. doi: org/10.1371/ journal.pone.026324
3. Development Of Technology Of Fermented Milk Drink With Immune Stimulating Properties / A. Serikova [et al.] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – July–August 2018. – Vol. 9 (4). – P. 495.

Выделение молочнокислых бактерий из ржанных хлебных заквасок спонтанного брожения

Сафонова М.Е., Найденко И.А., Денисенко В.В., Головнева Н.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by*

Ржаная мука характеризуется рядом особенностей, которые определяют ее хлебопекарные свойства. Для ржаного теста характерны повышенная вязкость и пластичность. Существенное влияние на качество ржаного теста оказывает его кислотность: получение стабильного и хорошо разрыхленного ржаного теста возможно только в кислой среде. Молочнокислые бактерии являются основными кислотообразователями в ржаном тесте [1].

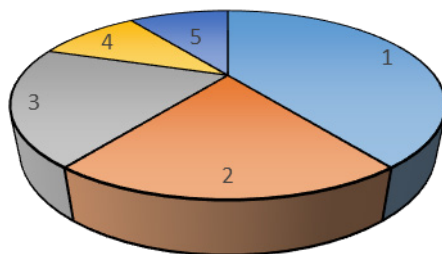
Основой совершенствования процесса хлебопечения является разработка технологий получения активных хлебных заквасок с улучшенными биотехнологическими свойствами, повышенной пищевой и биологической ценностью на основе специально отобранных штаммов микроорганизмов, оптимизации состава заквасочных консорциумов [2]. Хлебные закваски спонтанного брожения – основной источник получения новых культур молочнокислых бактерий, перспективных для включения в состав густых ржанных заквасок для хлебопечения.

С целью скрининга молочнокислых бактерий, перспективных для использования в составе консорциума для выведения густых ржанных заквасок, проведено выделение чистых культур из образцов ржаной муки и исследование морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств полученных микроорганизмов.

Ржаные закваски спонтанного брожения были приготовлены из цельнозерновой муки «Столичная мельница». Отбор проб для выделения бактерий производили через 24, 48, 72, 96, 120 ч. Культивирование накопительных культур и выделенных из них изолятов проводили в термостате в микроанаэробных условиях при температуре 28°C.

Были выделены 154 изолята, получены чистые культуры молочнокислых бактерий. Идентификацию выделенных бактерий проводили на основании изучения морфологических, культуральных, физиолого-биохимических свойств, а также результатов MALDI TOF масс-спектрометрии.

Установлено, что полученные чистые культуры молочнокислых бактерий принадлежали к рр. *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*. Большинство выделенных микроорганизмов являлись представителями рр. *Lactiplantibacillus* и *Pediococcus* (см. рисунок).



Молочнокислые бактерии, выделенные из ржаных заквасок спонтанного брожения:
1 – *Lactiplantibacillus*; 2 – *Pediococcus*; 3 – *Limosilactobacillus*; 4 – *Weissella*; 5 – *Lactococcus*

Оценка кислотообразующей способности выделенных культур после 16 ч культивирования в водно-мучной смеси (по Нейману) позволила отобрать для дальнейшего исследования 10 штаммов молочнокислых бактерий, относящихся к видам *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Weissella sibiria*.

Список использованных источников

1. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – 390 с.
2. Ауэрман, Л.Я. Технология хлебопекарного производства / Л.Я. Ауэрман. – СПб. : Профессия, 2005. – 416 с.

Характеристика штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1828 Г и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1829 Г – пробиотического компонента моющего средства с дезинфицирующим эффектом

Сверчкова Н.В.¹, Тригубович А.М.², Ванькевич Н.А.¹, Коломиец Э.И.¹,
Проскурнина И.А.¹, Ковальская Д.С.³

¹ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: gpro@biotech.bas-net.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Новым направлением в биотехнологии является использование спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в составе моющих и чистящих средств. Благодаря высокой антагонистической активности к патогенным и условно-патогенным клинически значимым бактериям, способности к синтезу широкого спектра гидролитических ферментов (протеазы, амилазы, целлюлазы, липазы, фосфатазы и др.), а также продукции поверхностно-активных веществ (циклические липопептиды сурфактины, лихенизины, фенгицины, итурины), усиливается моющая и дезинфицирующая способность препаратов на их основе. Показано, что циклические липопептидные биосурфактанты, образуемые *B. subtilis*, усиливают моющие свойства детергентов и сохраняют поверхностно-активные свойства в широком интервале рН (7,0–12,0) и температуры (30–120 °С) [1, 2].

В ходе скрининга бактерий с антимикробными, гидролитическими и поверхностно-активными свойствами были исследованы 70 вновь выделенных изолятов бактерий, из которых для дальнейшей работы были отобраны два наиболее активных спорообразующих штамма *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1828 Г и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1829 Г, обладающие комплексной ферментативной активностью: протеолитической 9,02 и 9,17 ед/мл, липолитической 0,1 и 0,11 ед/мл, ксиланазной 4,01 и 3,46 ед/мл соответственно. Антимикробная активность бесклеточной культуральной жидкости бактерий-антагонистов по отношению к условно-патогенным бактериям составила 25,0 и 26,0 мм (зоны задержки роста тест-культур) для *E. coli* КМИЭВ 39А, 35,0 и 30,0 мм для *S. aureus* КМИЭВ 107-В соответственно. Определение способности продуцировать биосурфактанты проводили с помощью физико-химических методов, основанных на способности биосурфактантов как поверхностно активных веществ (ПАВ) изменять поверхностное натяжение в системе вода-масло и их эмульсифицирующей и смачивающей способности [3, 4]. Получены следующие результаты для штаммов *B. amyloliquefaciens*

БИМ В-1828 Г и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1829 Г: диаметр зоны вытеснения масла составил 10,0 и 19,0 мм, диаметр капли на гидрофобной поверхности 8,0 и 8,0 мм, эмульсификация (значение индекса эмульгирования E24) 68,2 и 82,0 % соответственно.

При создании моющего средства важную роль играет подбор используемых компонентов, учитывающий необходимость применения биоинертных соединений, устойчивых к деструкции микроорганизмами. Исходя из этих требований оценивалась сохранность отобранных штаммов бактерий в водных растворах (3 %) различных групп компонентов моющих средств (см. таблицу).

Сохранность клеток бактерий штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1828 Г и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1829 Г в водных растворах компонентов моющих средств

Компоненты моющего средства	Титр <i>B. amyloliquefacien</i> БИМ В-1828 Г, КОЕ/мл s		Титр <i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1829 Г, КОЕ/мл	
	начальный	14 суток	начальный	14 суток
Контроль (без добавления компонентов)	$2,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
Дидецилдиметиламмония хлорид (ддаx)	$2,3 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^6$
Триамин	$2,6 \cdot 10^8$	$8,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^5$
Полигексаметиленгуанидин (пгмг)	$2,0 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^6$
Бензалкониум хлорид (бx)	$2,5 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^6$
Глиоксаль	$2,6 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^6$

Наименьшее снижение титра пробиотических бактерий в модельных образцах при их хранении (температура 20–25 °С) отмечено с бензалкониум хлоридом и полигексаметиленгуанидином (сохранность на уровне $1,7 \cdot 10^6$ – $8,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), что показывает возможность использования этих компонентов с культурами *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1828 Г и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1829 Г для разработки пробиотических моющих средств с дезинфицирующими свойствами.

Список использованных источников

1. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications / A. Roy // J. of Fundamentals of Renewable Energy and Applications. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 248–252.
2. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86 / S. Horowitz, J.N. Gilbert, W.M. Griffin // J. of Industrial Microbiology. – 1990. – Vol. 6, № 4. – P. 243–248.
3. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions / D.G. Cooper [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 1981. – Vol. 42, № 3. – P. 408–412.
4. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I.M. Banat [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology – 2010. – Vol. 87 (2). – P. 427–444.

Получение полимерных материалов с иммобилизованными бактериофагами, перспективных для лечения ран

Сидоренко А.В.¹, Савич В.В.¹, Красковский А.Н.², Гилевская К.С.², Куликовская В.И.², Ахмедов О.Р.³

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Гнойно-некротические заболевания мягких тканей остаются сложной проблемой в хирургии. Пациенты с гнойными ранами составляют 40–45 % больных хирургического профиля. Высокий показатель заболеваемости во многом обусловлен появлением у патогенных микроорганизмов множественной лекарственной устойчивости, что делает невозможным купирование инфекционного процесса с помощью большинства известных антибиотиков. Альтернативным методом лечения является использование раневых покрытий на основе биологически активных природных полимеров с иммобилизованными лекарственными препаратами антибактериального действия. Перспективным антимикробным компонентом ранозаживляющих средств могут служить бактериофаги – вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки.

Целью данной работы являлось получение потенциальных раневых покрытий на основе полимерных материалов с иммобилизованным бактериофагом, исследование их физико-химических свойств и биологической активности.

Методом криоструктурирования получены пористые материалы на основе пектина и хитозана. С помощью сканирующей электронной микроскопии установлено, что размер пор для пектиновых и хитозановых материалов составляет соответственно 65 ± 19 и 93 ± 26 мкм, плотность – $39,0 \pm 6,0$ и $64,0 \pm 2,0$ мг/см³. Степень набухания синтезированных материалов зависела от температуры, и при 37°C составляла соответственно 3284 ± 167 % и 2525 ± 408 % для пектина и хитозана. При изучении деградации в условиях *in vitro* выявлено, что хитозановые материалы более стабильны по сравнению с пектиновыми. Так, после 1 дня старения вес пектиновых материалов уменьшился на ~30 % и далее существенно не изменялся, вес хитозановых материалов – снизился на ~15 %, а через 7 дней потеря веса составила ~20 %.

Модельным объектом для иммобилизации на полимерных материалах служил бактериофаг *Escherichia phage* БИМ BV-67 Г из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, который характеризуется широким спектром литической активности в отношении бактерий *E. coli*. Опти-

мизированы условия иммобилизации данного бактериофага на поверхности пористых материалов из пектина и хитозана. Показано, что оптимальным является нанесение капельным методом очищенного препарата бактериофага на поверхность пектиновых и хитозановых материалов (1 мл фаголизата с концентрацией $\sim 10^8$ БОЕ/мл на образец диаметром $30,0 \pm 2,0$ мм) с последующим высушиванием при комнатной температуре или лиофилизацией.

Иммобилизация *Escherichia* phage БИМ BV-67 Г на пектиновых материалах, вероятно, происходила за счет специфической адсорбции. Иммобилизованные вирусные частицы медленно высвобождались в среду ($\sim 10^5$ БОЕ/мл через 1 ч для образцов, высушенных при комнатной температуре, и $\sim 10^2$ БОЕ/мл через 24 ч для лиофильно-высушенных образцов), снижалась литическая активность бактериофага (полного лизиса культуры *E. coli* БИМ В-984 Г не происходило, титр вирионов через 2 ч инкубации составил $\sim 10^4$ БОЕ/мл, через 24 ч инкубации – $\sim 10^8$ БОЕ/мл, независимо от способа высушивания образца).

Иммобилизация *Escherichia* phage БИМ BV-67 Г на материалах из хитозана, обусловленная неспецифическим связыванием, обеспечивала сохранность высокого титра вирусных частиц и их литической активности. Лизис культуры *E. coli* БИМ В-984 Г происходил через 1–1,5 ч для образцов, высушенных при комнатной температуре, 2–2,5 ч – для лиофильно высушенных образцов, 40–45 мин – в контроле (внесение очищенного фаголизата). Несмотря на различие во времени наступления лизиса индикаторной культуры, титр бактериофагов во всех случаях достигал $\sim 10^{10}$ БОЕ/мл.

При качественной оценке литической активности иммобилизованного бактериофага *Escherichia* phage БИМ BV-67 Г (чашечный тест) зона лизиса культуры *E. coli* БИМ В-984 Г вокруг образцов, высушенных разными методами, составляла 1–2 мм через 24 ч и >10 мм через 72 ч инкубации. Изучение стабильности при хранении показало, что бактериофаги, иммобилизованные на пористых материалах из хитозана, сохраняют литическую активность в течение 1 мес хранения при 4°C при лиофильном высушивании образцов, а при высушивании при комнатной температуре инактивация фага наблюдается через 14 дней. В опытах *in vivo* на моделях гнойных ран лабораторных животных установлено, что использование хитозановых материалов с иммобилизованными бактериофагами способствовало подавлению роста патогенных бактерий *E. coli* и более быстрому регенерационному процессу раневой поверхности.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант № M21УЗБГ-021.

Создание штаммов – продуцентов технических ферментов

Синицын А.П.¹, Синицына О.А.¹, Рожкова А.М.², Зоров И.Н.¹,
Рубцова Е.А.², Шашков И.А.², Сатрутдинов А.Д.², Цурикова Н.В.³,
Костылева Е.В.³, Середа А.С.³, Великорецкая И.А.³

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
электронный адрес: apsinitsyn@gmail.com

²ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ВНИИПБТ – филиал ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи РАН,
Москва, Россия

Микроскопические грибы широко применяются для промышленного производства технических ферментов. Для получения высокоактивных штаммов – продуцентов таких ферментов мы использовали два подхода: индуцированный мутагенез и методы генетической инженерии. В результате γ -мутагенеза получены штаммы грибов рода *Trichoderma* – продуценты целлюлаз, ксиланаз и пектиназ, накапливающие в культуральной жидкости до 35–40 г/л внеклеточного белка. С помощью комбинированного УФ- и γ -мутагенеза получен штамм *Aspergillus awamori* с увеличенной продукцией глюкоамилазы. Создана система экспрессии для *Penicillium verruculosum* В1-537 (*DeltaD*), позволяющая трансформировать реципиентный штамм экспрессионными конструкциями, содержащими целевые гетерологичные или гомологичные гены, функционально связанные с индуцибельным промотором и терминатором гена мажорного секреторного белка целлюбиогидролазы I (*cbh1*) *P. verruculosum*. Реципиентный штамм *P. verruculosum* характеризуется высокой секреторной способностью (до 60 г/л внеклеточного белка). Сконструированы рекомбинантные штаммы – продуценты целлюлаз, β -глюканаз, ксиланаз, фитазы, кислой протеазы, пектин-лиазы, β -глюкозидазы, экзо- и эндо-инулиназ. Созданные продуценты различных ферментов используются для их промышленного производства на заводе ООО «Агрофермент».

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021).

Биотехнологическая трансформация мискантуса гигантского

Скиба Е.А.

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН,
Бийск, Россия,
электронный адрес: eas08988@mail.ru*

Мискантус гигантский – энергетическая культура, занимающая одну из ведущих мировых позиций среди целлюлозосодержащего сырья. Благодаря высокой скорости роста, содержанию целлюлозы, превышающему его содержание в древесине (50–55 % против 35–50 %), дешевизне возделывания, объем посадок мискантуса ежегодно увеличивается во всем мире. Мискантус перерабатывается в бумагу, картон, биобетон, химические производные целлюлозы, продукты микробиологического синтеза [1].

Бактериальная nanoцеллюлоза (БНЦ) – уникальный микробный полимер, который благодаря наноразмерности и химической чистоте обладает свойствами, отличными от любых растительных целлюлоз, и имеет огромный спектр применений. В связи с особенностями метаболизма продуцентов БНЦ ее выход невысок, а себестоимость значительна, поэтому одним из путей снижения себестоимости является использование дешевого сырья. Концепция биосинтеза дорогой БНЦ из дешевой растительной целлюлозы стала одной из направляющих в развитии технологии получения БНЦ [2].

В данной работе исследовано 4 способа предварительной химической обработки мискантуса гигантского сорта Камис (ООО «Мастер Брэнд», Москва) с помощью разбавленных растворов HNO_3 и NaOH при атмосферном давлении на опытном производстве в стандартном оборудовании объемом 250 л. Цель химической предобработки – получение реакционноспособных субстратов для последующего ферментативного гидролиза. Методики предобработки и гидролиза мискантуса приведены в работе [3]. Химический состав субстратов определен стандартными «мокрыми» методами и приведен в пересчете на сухое вещество, методы и химический состав сырья приведены в работе [4]. Полученные ферментативные гидролизаты были стандартизованы по содержанию редуцирующих веществ и экстрактивных веществ черного чая и использованы в качестве питательной среды для биосинтеза БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в статических условиях. Подробности методики приведены в работе [5]. Выходы полупродуктов и продукта (БНЦ) рассчитаны на абсолютно сухое вещество (см. таблицу).

Выход БНЦ сильно зависит от способа предварительной химической обработки мискантуса гигантского, стадии ферментативного гидролиза субстратов и биосинтеза БНЦ осуществлены в идентичных условиях. Наибольший выход

БНЦ от редуцирующих веществ (РВ) получен на питательных средах из субстратов, обработанных кислотой и щелочью двухстадийно (11,7 и 10,4 %), что можно объяснить химической чистотой данных субстратов. Это хорошо коррелирует с данными работы [4], в которой БНЦ была получена из мискантуса сахароцветкового в аналогичных условиях. В данной работе для мискантуса гигантского отмечается повышение выхода БНЦ в 1,6–1,8 раза по сравнению с выходом БНЦ из мискантуса сахароцветкового.

Выход БНЦ из мискантуса гигантского сорта Камис

Способ предобработки мискантуса	HNO ₃	HNO ₃ , затем NaOH	NaOH	NaOH, затем HNO ₃
Химический состав полученных субстратов				
М. д. целлюлозы, %	85,7	92,8	84,7	91,5
М. д. пентозанов, %	6,0	1,6	2,3	2,0
М. д. лигнина, %	8,1	1,1	8,2	0,2
Зольность, %	1,00	0,43	3,94	0,06
Материальный баланс выхода полупродуктов и продукта				
Выход субстрата от массы мискантуса	37,4	32,8	29,9	26,0
Концентрация РВ в гидролизате, г/л	20,2	20,6	12,0	19,0
Выход РВ от массы субстрата, %	60,7	61,7	36,0	57,0
Выход БНЦ от РВ, %	8,6	11,7	3,0	10,4
Выход БНЦ от массы мискантуса, %	1,9	2,3	0,3	1,5

При пересчете на исходное сырье наибольший выход зафиксирован для двухстадийной химической предварительной обработки мискантуса гигантского HNO₃, а затем NaOH, что объясняется повышенным выходом субстрата на стадии предварительной обработки. Таким образом, предварительная обработка мискантуса гигантского является критической стадией в технологической цепочке его трансформации в БНЦ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107.

Список использованных источников

1. Miscanthus: A fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production / C. Wang [et al.] // *GCB Bioenergy*. – 2021. – Vol. 13 (1). – P. 58–69. doi: org/10.1111/gcbb.12761
2. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review / Z. Hussain [et al.] // *Cellulose*. – 2019. – Vol. 26. – № 5. – P. 2895–2911. doi: org/10.1007/s10570-019-02307-1
3. Kashcheyeva, E.I. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis / E.I. Kashcheyeva, Y.A. Gismatulina, V.V. Budaeva // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11 (10). – P. 1645. doi: 10.3390/polym11101645
4. Evaluation of Chemical Composition of Miscanthus × giganteus Raised in Different Climate Regions in Russia / Y.A. Gismatulina [et al.] // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – P. 2791. doi: org/10.3390/plants11202791
5. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass / E.A. Skiba [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 252. – P. 117–178. doi: org/10.1016/j.carbpol.2020.117178

Интегрированная технология переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в востребованные продукты

Скиба Е.А., Будаева В.В.

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения
РАН, Бийск, Россия,
электронный адрес: eas08988@mail.ru*

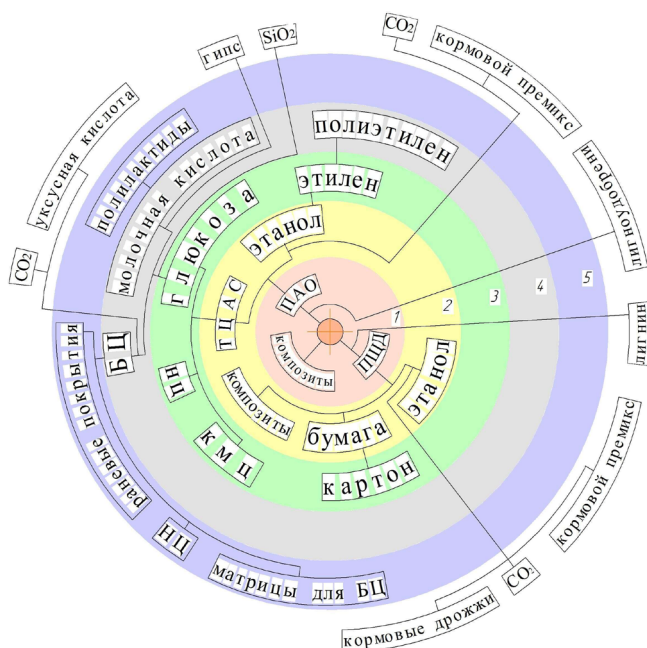
Целлюлозосодержащее сырье способно заменить топливо, химические реактивы и материалы [1]. Интегрированный подход к переработке целлюлозосодержащего сырья, включающий химические, биотехнологические, физические процессы, позволяет создать целый ряд востребованных экономикой продуктов с высокой добавленной стоимостью [2]. Важным аспектом является безотходность производства, когда в коммерческие продукты превращаются все компоненты целлюлозосодержащего сырья. Это базовый принцип, позволяющий достигать рентабельности производства [3].

В данной работе на основе многолетних исследований предложен интегрированный подход для переработки шелухи овса. Мы предложили этот вид сырья в 2005 г., и в настоящее время он признан в мировом сообществе [4].

На первом технологическом уровне сырье обрабатывается разбавленным раствором азотной кислоты с получением продукта азотнокислой обработки (ПАО) и лигногуминового удобрения (на рисунке удобрение выведено на внешний уровень как побочный продукт) либо раствором гидроксида натрия с получением продукта щелочной делигнификации (ПЩД) и отработанного раствора, предназначенного для получения биобетона либо выделения лигнина. Напрямую сырье может быть использовано в составе биокомпозитов либо для получения топливных пеллет.

На втором технологическом уровне по биотехнологическому пути как ПАО, так и ПЩД могут быть превращены в биоэтанол и кормовой премикс на основе барды, кроме того, из барды ПЩД может быть получен кормовой белок; по химическому пути из ПАО и ПЩД можно выделить технические целлюлозы (ТЦ).

ТЦ из ПАО предназначена для химической этерификации (получения нитратов целлюлозы, карбоксиметилцеллюлозы и метилцеллюлозы) и для ферментативного гидролиза и последующего биосинтеза на полученной питательной среде бактериальной наноцеллюлозы или молочной кислоты. На всех уровнях полупродукты и продукты могут быть использованы для создания гибридных композиционных материалов. Биоэтанол позиционируется как сырье для получения химических реактивов (получен этилен и определены требования к качеству биоэтанола-сырья), а также водорода.



Интегрированная схема переработки легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья в востребованные продукты: 1–5 – уровни технологической трансформации; ПАО – продукт азотной обработки; ПЩД – продукт щелочной делигнификации; ТЦ – техническая целлюлоза; НЦ – нитраты целлюлозы; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; БЦ – бактериальная наноцеллюлоза

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (проект 121 061 500 030-3).

Список использованных источников

1. Giuliano, A. The Transition of Scientific Research from Biomass-to-Energy/Biofuels to Biomass-to-Biochemicals in a Biorefinery Systems Framework / A. Giuliano // *Energies*. – 2023. – Vol. 16 (5). – P. 2261. doi: org/10.3390/en16052261
2. A multi-layered view of chemical and biochemical engineering / R. Gani [et al.] // *Chemical Engineering Research and Design*. – 2020. – Vol. 155. – P. A133–A145. doi: org/10.1016/j.cherd.2020.01.008
3. What is still Limiting the Deployment of Cellulosic Ethanol? Analysis of the Current Status of the Sector / M. Padella [et al.] // *Appl. Sci*. – 2019. – Vol. 9. – P. 4523. doi: org/10.3390/app9214523
4. Biorefining Oat Husks into High-Quality Lignin and Enzymatically Digestible Cellulose with AcidCatalyzed Ethanol Organosolv Pretreatment / R. Chopda [et al.] // *Processes*. – 2020. – Vol. 8. – P. 435. doi: org/10.3390/pr8040435

Влияние биологически активных веществ растительного сырья на биосинтез бактериальной наноцеллюлозы

Шавыркина Н.А.

Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия, электронный адрес: 32nadina@mail.ru

Целлюлоза – распространенный полисахарид, который получают из природных источников, таких как древесина, сезонные растения, водоросли и бактерии. Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) продуцируется бактериальными штаммами в виде внеклеточного материала. БНЦ по своей природе характеризуется высокой водопоглощающей способностью, хорошей термической и механической стабильностью, биосовместимостью и способностью к биоразложению [1]. Доступность биосинтетической целлюлозы уравнивает высокий спрос на нее, уменьшая истощение возобновляемых лесных ресурсов [2]. Постоянно ведутся исследования, направленные на повышение эффективности биосинтеза БНЦ, – поиск новых способов культивирования, источников углерода, активаторов биосинтеза, совершенствование конструкций биореакторов и т. п. [3].

В данной работе приведены результаты исследований биосинтеза БНЦ на средах из различных растительных экстрактов: черного байхового чая (контроль, использовали чай марки «Принцесса Нури», компания «Орими Трейд», Санкт-Петербург), зеленого чая марки «Richard» (компания «МАЙ», Санкт-Петербург), цветков липы и цветков ромашки аптечной (АО «Красногорсклексредства», Красногорское). Для получения питательных сред сухое растительное сырье в количестве 10 г/л заливали кипящей дистиллированной водой, вносили глюкозу в количестве 20 г/л, выдерживали 15 мин, осадок отфильтровывали. Среду охлаждали, вносили инокулят в количестве 10 об/%. В качестве инокулята использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12. Культивирование вели стационарно при температуре 27 °С на протяжении 14 сут. После окончания биосинтеза пленки БНЦ отмывали согласно авторской методике [4], сушили на воздухе и рассчитывали выход БНЦ в пересчете на углеводный субстрат (глюкозу). В процессе биосинтеза фиксировали изменение концентрации водорастворимых экстрактивных веществ (согласно ГОСТ Р ИСО 9768-2011), суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид (ГФ РФ ОФС.2.5.0061.18), дубильных веществ в пересчете на танин (ГФ РФ ФС.1.5.3.0008.15), в средах на основе черного и зеленого чая также исследовали динамику концентрации кофеина (ГОСТ 30 059-93). В таблице приведены данные об изменении концентраций экстрактивных и биологически активных веществ растительного сырья в процессе биосинтеза БНЦ, а также полученные выходы БНЦ.

Изменение концентрации экстрактивных и биологически активных веществ растительного сырья в процессе биосинтеза и БНЦ

Растительное сырье	Продолжительность культивирования, сут	Концентрация, %				Выход БНЦ, %
		экстрактивных веществ	флавоноидов	дубильных веществ	кофеина	
Чай черный	0	2,00	0,005	0,91	2,5	7,5
	7	1,68	0,005	0,91	2,2	
	14	1,00	0,005	0,91	1,8	
Чай зеленый	0	2,50	0,007	4,71	3,3	9,2
	7	1,18	0,007	4,71	3,0	
	14	0,48	0,007	4,71	2,5	
Цветки липы	0	1,80	0,01	0,11	–	6,1
	7	1,10	0,01	0,11	–	
	14	0,86	0,01	0,11	–	
Цветки ромашки аптечной	0	2,10	0,005	0,19	–	4,5
	7	1,66	0,005	0,19	–	
	14	0,90	0,005	0,19	–	

Можно отметить, что количество экстрактивных веществ в процессе биосинтеза снижается в среднем в 2 раза во всех образцах, кроме экстракта цветков липы, где этот показатель снизился в 5 раз. Количество флавоноидов и дубильных веществ не изменялось в процессе культивирования. Содержание кофеина в образцах чайных экстрактов снизилось в 1,3–1,4 раза, при этом начальное содержание кофеина в экстракте зеленого чая было в 1,3 раза большим, чем в экстракте черного чая. Возможно, поэтому самый высокий выход БНЦ был получен при культивировании продуцента в среде с экстрактом зеленого чая – 9,2 % (против 7,5 % в контрольной среде). Таким образом, более целесообразно проводить биосинтез БНЦ в среде с экстрактом зеленого чая.

Список использованных источников

1. Opportunities for bacterial nanocellulose in biomedical applications: Review on biosynthesis, modification and challenges / P. Samyn [et al.] // Internat. J. of Biolog. Macromolecules. – 2023. – P. 123–136. doi: org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123316
2. A review on the life cycle assessment of cellulose: From properties to the potential of making it a low carbon material / F. Foroughi [et al.] // Materials. – 2021. – Vol. 14, № 4. – P. 714. doi: org/10.3390/ma14040714
3. Xue, Y. Nanocellulose as a sustainable biomass material: structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications / Y. Xue, Z. Mou, H. Xiao // Nanoscale. – 2017. – Vol. 9, № 39. – P. 14758–14781.
4. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 / E.K. Gladysheva [et al.] // Appl. Biochem. and Microbiol. – 2018. – Vol. 54, № 2. – P. 179–187. doi: 10.1134/S0003683818020035

Фундаментальные подходы получения биопродуктов из мискантуса для снижения углеродного следа

Шавыркина Н.А.

*Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия,
электронный адрес: 32nadina@mail.ru*

Возрастающий уровень потребления энергетических и сырьевых ресурсов в мировом масштабе поднимает глобальные проблемы, касающиеся всего человечества: 1) обеспечение энергией всех сфер человеческой деятельности в свете истощения ископаемых источников энергии; 2) снижение экологических последствий хозяйственной деятельности человека [1].

В первом случае решение проблем лежит в области поиска альтернативных источников энергии – энергии солнца, ветра и биомассы с акцентом на их управляемость [2]. Пути решения второй проблемы имеют несколько направлений – разработка более экологичных производственных технологий, разработка способов вторичного использования и утилизации отработанных изделий и материалов, внедрение биотехнологий для частичной замены химических процессов. В частности, ученые считают, что повышение температуры за счет антропогенных газов (в первую очередь CO_2), концентрация которых увеличилась почти на 50 % с начала промышленной революции, является серьезной угрозой экологии планеты [3]. Одним из возможных путей снижения углеродного следа является культивирование растений с высокой скоростью роста, интенсивным уровнем биосинтеза и образованием значительного количества биомассы. При культивировании такие растения активно поглощают углекислый газ, выделяют кислород, их биомасса может служить сырьем для химических и биотехнологических трансформаций [4]. К таким экологически и промышленно перспективным растениям можно отнести мискантус.

Внедряя углеродные мискантусные фермы и разрабатывая биотехнологии переработки биомассы мискантуса, можно добиться снижения углеродного следа по следующим направлениям:

после предварительной обработки биомассы мискантуса и последующего сбраживания можно получать биогаз [1] и биоэтанол [5]. Биоэтанол, в свою очередь, может быть биокаталитически трансформирован в этилен [6];

применяя ферментативный гидролиз предварительно обработанной биомассы мискантуса, можно получать доброкачественные питательные среды для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы [7, 8];

используя биомассу мискантуса, подвергнутую паровому взрыву, можно индуцировать биосинтез целлюлолитических ферментов, которые затем выделяют из культуральной жидкости [9].

Таким образом, проведение научных исследований в области переработки биомассы мискантуса и последующее внедрение новых знаний в промышленные процессы позволит существенно сократить углеродный след, что, в свою очередь, будет способствовать улучшению экологической обстановки на планете.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Biogas generation from biomass as a cleaner alternative towards a circular bioeconomy: Artificial intelligence, challenges, and future insights / Q. Wang [et al.] // *Fuel*. – 2023. – Vol. 333. – P. 126456. doi: org/10.1016/j.fuel.2022.126456
2. Renewable Energy and Energy Storage Systems / E.T. Sayed [et al.] // *Energies*. – 2023. – Vol. 16, № 3. – P. 1415. doi: org/10.3390/en16031415
3. Trusina, I. The scientific discourse on the concept of sustainable development / I. Trusina, E. Jermolajeva // *Eastern Journal of European Studies*. – 2021. – Vol. 12, № 2. – P. 298–322.
4. Valorisation of lignocellulosic biomass to value-added products: Paving the pathway towards low-carbon footprint / G. Velvizhi [et al.] // *Fuel*. – 2022. – Vol. 313. – P. 122678. doi: org/10.1016/j.fuel.2021.122678
5. Скиба, Е.А. Преимущества совмещения биокаталитических стадий в синтезе биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья / Е.А. Скиба, Г.Ф. Миронова // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 53–60. doi: org/10.21285/2227-2925-2016-6-4-53-60
6. Miscanthus bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene / E.A. Skiba [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2022. – Vol. 177. – P. 114448. doi: org/10.1016/j.indcrop.2021.114448
7. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass / E.A. Skiba [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 252. – P. 117–178. doi: org/10.1016/j.carbpol.2020.117178
8. Enhanced Production of Bacterial Cellulose from Miscanthus as Sustainable Feedstock through Statistical Optimization of Culture Conditions / J. Son [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19, № 2. – P. 866. doi: org/10.3390/ijerph19020866
9. Xiang, J. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius* / J. Xiang, X. Wang, T. Sang // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 160. – P. 113–129. doi: org/10.1016/j.indcrop.2020.113129

Микробные технологии в переработке послеспиртовой барды

Шепшелев А.А.¹, Сапунова Л.И.¹, Ерхова Л.В.¹, Глушень Е.М.¹,
Соловей В.И.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: name@email.su

²РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по продовольствию», Минск, Беларусь,
электронный адрес: info@belproduct.com

Спиртовыми предприятиями Республике Беларусь в год выпускается этилового ректифицированного спирта более 8 млн дал, при этом образуется свыше 100 млн дал (1000 тыс. м³) послеспиртовой барды. Анализ технологической оснащённости спиртовых предприятий показал, что только на 4 из 21 спиртовых предприятиях (филиалах, производственных участках, цехах) Республики Беларусь реализован усеченный цикл переработки барды с получением сырой дробины, срок хранения которой составляет не более 5 сут. По этой причине вопрос разработки и внедрения эффективных технологий переработки послеспиртовой барды остается актуальным в настоящее время.

В мире существуют разнообразные технологии переработки барды, однако наибольшую популярность приобрела так называемая технология DDGS, предусматривающая разделение барды на кек и фугат, выпаривание фугата до содержания сухих веществ 30–35 %, смешивание его с обезвоженным кеком и последующей сушкой. Недостатком данной технологии является высокая стоимость выпарных станций и вспомогательного оборудования, кроме того процесс выпарки требует значительных энергетических затрат и существенно снижает экономическую эффективность всей технологии, а утилизация получаемого в процессе выпарки конденсата в технологии не предусмотрена и несет за собой дополнительную экологическую нагрузку.

В последнее время в мире проводятся исследования по глубокой переработке спиртовой барды путем микробной или ферментативной трансформации комплекса содержащихся в ней питательных веществ с последующей микробной очисткой фугата.

В данном направлении проводятся исследования в Институте микробиологии НАН Беларуси. В частности, изучена возможность использования микроорганизмов в процессе переработки жидкофазной барды (рис. 1). Показано, что в неоптимизированных условиях в зависимости от используемого микроорганизма концентрация белка в кеке цельной барды повышалась на 54,6–141,2 %. Содержание свободных редуцирующих сахаров варьировалось: отмечено как снижение на 40,6–44,2 %, так и увеличение данного показателя

на 26,1–49,3 %. Это может объясняться различием физиологических потребностей микроорганизмов в питательных веществах для активного роста и составом синтезируемых ими ферментов, участвующих в деструкции трудногидролизуемых полисахаридов спиртовой барды.

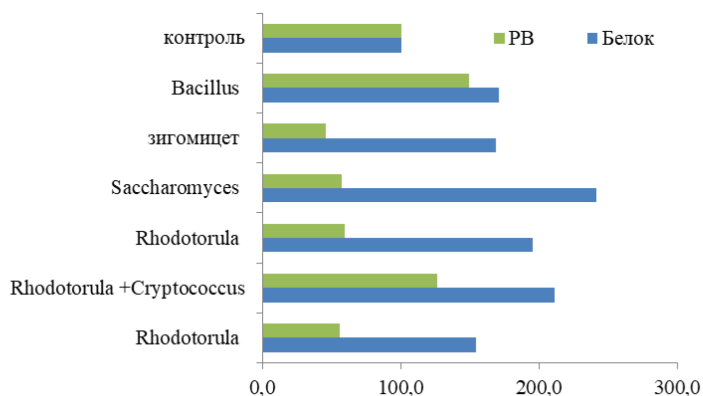


Рис. 1. Влияние микробной ферментации цельной барды в глубинных условиях на содержание растворимого белка и редуцирующих веществ в кеке

Кроме того, установлено, что в фильтрате цельной спиртовой барды, подвергнутой микробной ферментации, существенно снижается концентрация сахаров (на 32,7–69,7 %) и в меньшей мере фосфора (на 6,3–14,0 %).

В дальнейшем показана эффективность использования микроорганизмов для обработки фугата послеспиртовой барды с целью ее доочистки (рис. 2). В результате проведенных исследований были подобраны штаммы микроорганизмов, обеспечивающие достижение соответствующих показателей ПДК для сброса стоков в городскую канализацию.



1. Фугат послеспиртовой барды;
2. Фугат после реагентной обработки;
3. Фугат после микробной доочистки.

Рис. 2. Фугаты послеспиртовой барды до, после реагентной обработки и последующей очистки с использованием микроорганизмов

Таким образом, установлена возможность и целесообразность реализации отечественной технологии переработки послеспиртовой барды с использованием микроорганизмов.

Основы безотходной технологии получения микробных пробиотических препаратов

Щетко В.А., Романова Л.В., Гапонова И.И., Макаревич О.В., Головнева Н.А.,
Сафонова М.Е., Самарцев А.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by*

При получении микробных препаратов с пролонгированными сроками годности (концентрированных или сухих товарных форм) помимо процесса культивирования большое значение имеет постферментационная стадия, первым этапом которой является фракционирование культуральной жидкости и отделение взвешенной фазы – биомассы бактерий для последующей ее сушки. Образующийся на этой стадии супернатант представляет собой сложную смесь биологически активных соединений, включая остатки компонентов питательной среды, продукты метаболизма бактериальных клеток (аминокислоты, витамины, холин, органические кислоты, летучие жирные кислоты, бактериоцины, стероидные вещества и др.) в усвояемой форме. В большинстве случаев оставшаяся после отделения биомассы микроорганизмов бесклеточная культуральная жидкость рассматривается как отход производства, утилизация которого приводит к значительным экономическим потерям и загрязнению окружающей среды. Современные исследования показали, что комплексы микробных метаболитов – метабиотики проявляют биологическую активность, подавляют развитие патогенной микробиоты и стимулируют рост полезных микроорганизмов, влияют на показатели гуморального иммунитета организма хозяина. Метабиотики находят применение в качестве кормовых добавок в животноводстве как потенциальная замена антибиотиков [1, 2]. Показано, что применение метабиотиков в качестве кормовой добавки в животноводстве способствует росту и здоровью бройлеров, несушек и поросят [3], а также улучшает процессы ферментации в рубце [4].

Целью исследования была разработка основ безотходной технологии производства сухих бактериальных препаратов путем дальнейшего использования бесклеточной культуральной жидкости.

Образцы бесклеточной культуральной жидкости получены на основе пробиотических бактерий родов *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Pediococcus* и *Propionibacterium* путем их культивирования в течение 20–24 ч при 30 °С на модифицированной питательной среде MRS, включающей глюкозу, дрожжевой экстракт, пептон, соли фосфорной кислоты, с последующим отделением клеток бактерий при проточном центрифугировании.

В полученных супернатантах определяли показатель КОЕ/мл, титруемую и активную кислотность. Титруемая кислотность составила от 120 до 180 °Т, рН – 4,1–4,7. Показано присутствие в супернатантах после отделения биомассы жизнеспособных клеток – от 0,6 до 14 % (в зависимости от вида бактерий), что может влиять на качество продукта при хранении (см. таблицу).

Остаточное количество жизнеспособных клеток в супернатантах культуральной жидкости после отделения биомассы бактерий

Бактерия	Количество жизнеспособных клеток в КЖ, КОЕ/мл	Остаток жизнеспособных клеток в супернатантах, %
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	$1,6 \cdot 10^{10}$	1,8
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	$1,1 \cdot 10^{10}$	0,9
<i>Propionibacterium</i> sp.	$5 \cdot 10^9$	14
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	$3 \cdot 10^9$	0,6–1,9
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	$2,1 \cdot 10^{10}$	14

В связи с этим разработан способ инактивации остаточных клеток, включающий специально подобранный температурный режим обработки супернатанта культуральной жидкости в сочетании с окислительным стрессом.

Проведены предварительные испытания эффективности полученного продукта при применении его в качестве кормовой добавки в корма для дойных коров. Показана экономическая целесообразность использования метабактериоцика в рационах дойного стада для повышения рентабельности производства молока.

Список использованных источников

1. Effects of feeding metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal microbial population, small intestine villus height and faecal volatile fatty acids in broilers / N.T. Thanh [et al.] // Br. Poult. Sci. – 2009. – Vol. 50. – P. 298–306.
2. Рябая, Н.Е. Метабиотики – новые стратегии для улучшения здоровья человека и животных / Н.Е. Рябая, Н.А. Головнева, А.А. Самарцев // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / редкол.: Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2022. – Т. 14. – С. 317–329.
3. Effects of different levels of metabolite combination produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, diarrhoea, gut environment and digestibility of postweaning piglets / T.C. Loh [et al.] // J. Appl. Anim. Res. – 2013. – Vol. 41. – P. 200–207.
4. *In vitro* study of postbiotics from *Lactobacillus plantarum* RG14 on rumen fermentation and microbial population / W.I. Izuddin [et al.] // Rev. Bras. Zootec. – 2018. – Vol. 47.

Секция 5

Природоохранные биотехнологии

Влияние различных концентраций нефти и нефтепродуктов на рост новых штаммов-деструкторов

Акатова Е.В., Абащева М.А.

*ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия,
электронный адрес: katiakatova@gmail.com*

Эффективность биоремедиации загрязненных нефтью и нефтепродуктами объектов окружающей среды зависит от активности как аборигенной микрофлоры, так и от внесенных с биопрепаратами микроорганизмов [1]. На скорость биodeградации влияют множество факторов, в том числе концентрация загрязнителя. Высокие концентрации углеводов вызывают ингибирование биodeградации за счет токсического действия летучих углеводов или недостатка кислорода и питательных веществ [2, 3].

Целью данной работы было определение влияния различных концентраций нефти, дизельного топлива, н-гексадекана и нафталина на рост штаммов-деструкторов.

Ранее из незагрязненного торфа методом накопительных культур были отобраны 7 штаммов. Штаммы выращивали в жидкой минеральной среде Эванса с добавлением различных концентраций исследуемых субстратов при температуре 28 °С в шейкере-инкубаторе (ES-20/60, Biosan) со скоростью вращения 180 об/мин. После 7 дней культивирования проводили оценку интенсивности роста штаммов на основании значений оптической плотности (A_{590}) культуральной среды. Критерии анализа полученных результатов были следующими (см. таблицу): при показаниях оптической плотности равной 2 и более рост считался очень хорошим, хороший рост отмечали при $A_{590} = 1-2$, умеренный рост – при $A_{590} = 0,5-1$ и слабый рост – при $A_{590} = 0,2-0,5$.

Анализ роста штаммов на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии показал, что все штаммы кроме N98 практически не растут на данном субстрате. Увеличение концентрации дизельного топлива оказало ингибирующее влияние на рост всех штаммов кроме D7, слабый рост которого увеличивался с увеличением концентрации дизеля в среде в 1,5 раза. Слабое негативное влияние на интенсивность роста большинства штаммов оказывало и увеличение концентрации в среде н-гексадекана. При этом самое резкое подавление роста оказала концентрация н-гексадекана 2 % на штаммы HD60 и N108. Подобные влияния увеличения концентраций дизельного топлива и н-гексадекана на рост микроорганизмов отмечали и в других работах [1, 4, 5]. С увеличением концентрации нефти в среде интенсивность роста штамма P31 увеличилась практически в 2 раза, тогда как на штамм D7 увеличение концентрации нефти оказало обратный эффект.

Рост штаммов на различных субстратах разных концентраций*

Штамм	Исходный субстрат	Концентрация субстрата, %								
		н-гексадекан			дизельное топливо			нефть		
		0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
D7	дизельное топливо	++	++	++	–	–	–	+	±	–
P31	нефть	++	+	+	+	+	±	±	+	+
P45	нефть	+	+	+	±	±	–	+	+	+
HD53	н-гексадекан	++	+	+	+	+	±	+	+	+
HD60	н-гексадекан	++	++	±	–	±	–	–	±	+
N98	нафталин	±	±	–	–	–	–	–	–	–
N108	нафталин	++	++	+	+	–	–	+	+	+

*Интенсивность роста: слабый рост (–), умеренный рост (±), хороший рост (+) и очень хороший рост (++)

В результате оценки было также отмечено, что штаммы D7 и N108 выделенные, соответственно, из накопительных культур с дизельным топливом и нафталином, в данной работе показали слабый рост на данных субстратах, но при этом хорошо росли на н-гексадекане.

В результате анализа полученных данных установили, что способность штаммов к росту на анализируемых субстратах снижается в ряду н-гексадекан, нефть, дизельное топливо, нафталин. В основном наблюдалась тенденция к снижению интенсивности роста штаммов при увеличении концентрации субстратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 («Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами»).

Список использованных источников

1. Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel / M. Hawrot-Paw [et al.] // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 16436.
2. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing / L. Yuste [et al.] // FEMS Microbiol Ecol. – 2000. – Vol. 32, № 1. – P. 69–75.
3. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil / C.H. Chaîneau // Soil. Biol. Biochem. – 2005. – Vol. 37, № 8. – P. 1490–1497.
4. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using *Pseudomonas* species isolated from petroleum contaminated soil / V. Kumar // Orient. J. Chem. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 1771–1776
5. Tebyanian, H. Hexadecane-degradation by *Teskumurella* and *Stenotrophomonas* strains isolated from hydrocarbon contaminated soils / H. Tebyanian, M. Hassanshahian, A. Kariminik // Jundishapur. J. Microbiol. – 2013. – Vol. 6, № 7. – P. 9182.

Комплексный подход к созданию новых микробных препаратов для биоремедиации техногенно нарушенных почв

Беловежец Л.А.¹, Третьякова М.С.², Маркова Ю.А.²

¹*ИрИХ СО РАН, Иркутск, Россия*

²*СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия*

Россия является одной из ведущих стран по объемам добычи нефти и древесины. Огромное количество отходов лесоперерабатывающей промышленности, проливов нефти, их токсичность для окружающей среды, способность к самовозгоранию и отсутствие эффективных методов переработки приводит к серьезным экологическим проблемам. В работе использовались сложные органические субстраты (нефть, опилки, гидролизный лигнин), отличающиеся многокомпонентностью состава и нерегулярностью химического строения. Однако все они являются биогенными, содержат большое количество конденсированных фенольных соединений, которые при микробном разложении оказывают токсическое действие на окружающую среду. Следует отметить, что все исследуемые субстраты являются крупнотоннажными загрязнителями, занимающими огромные площади, и универсальный способ их обезвреживания или утилизации до настоящего времени отсутствует.

Целью работы была разработка комплексного подхода к биотрансформации лигноцеллюлозных субстратов и нефти микроорганизмами.

Результаты исследования выявили однотипность процессов, происходящих при компостировании лигноцеллюлозных отходов и ремедиации почв от нефти. Одним из основных параметров трансформации исследуемых субстратов является увеличение фитотоксичности, совпадающее с максимумами активности оксидоредуктазных ферментов. Параллельно происходит направленное изменение количества основных групп микроорганизмов, индуцированное как внесением микробной ассоциации, так и наличием продуктов промежуточного разложения субстрата. Можно утверждать, что микробная переработка обязательно сопровождается всплеском токсичности перерабатываемого субстрата, однако за счет эффективной работы ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности приходят в норму. Соответственно, процессы, растягивающиеся на десятилетия без обработки, происходят в течение 2–3 месяцев и приводят к полному отсутствию токсичности продукта. Кроме того, в результате комплексного исследования выявлена многофакторная биологическая деятельность микроорганизмов, входящих в состав препаратов, позитивно влияющая на свойства переработанных лиг-

ноцеллюлозных отходов и очистку почвы от нефти. Так, установлено фитостимулирующее действие микроорганизмов, основанное на их способности синтезировать биологически активные вещества, такие как аминокислоты и фитогормоны. Выявлена способность микроорганизмов синтезировать биогенные поверхностно-активные вещества – биосурфактанты, исследованы их структура и основные физико-химические свойства. Доказано, что влияние этих соединений на выживаемость растений в условиях загрязнения почвы нефтью происходит за счет эмульгирования нефтяной пленки на поверхности корней. Показана антибактериальная и фунгицидная активность, обеспечивающая оздоровление почвы, что также улучшает состояние растений. Комплекс образующихся биологически активных веществ обеспечивает микроорганизмам, входящим в состав препаратов, приоритет как эффективным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам. Все это способствует сохранению и восстановлению растительного покрова и микробиоценоза, характерного для интактных почв.

Исследование поддержано грантом РФФИ, проект № 20-016-00114 А.

Эффективность применения препарата «Бионейт» для сточных вод, осложненных высоким содержанием хлорсодержащих дезинфицирующих средств

Бирюков Р.Н., Глушень Е.М.

*Институт микробиологии НАН Беларусь, Минск, Беларусь,
электронный адрес: olia.bir@yandex.ru*

Согласно научным исследованиям в результате обработки сточных вод хлорсодержащими дезинфицирующими средствами, например, в процессе аминирования, возрастает уровень мутагенной и канцерогенной нагрузки в отношении биоценоза активного ила [1–3]. В сбрасываемых сточных водах активный хлор представлен следующими соединениями, обладающими биоцидным действием: растворенный молекулярный хлор, его производные (оксиды хлора), хлорамины и гипохлориты. Такие хлорсодержащие молекулы прежде всего взаимодействуют с азотсодержащими соединениями с образованием моно-, ди- и трихлораминов, а затем уже вступают в реакции окисления с органическим веществом [1, 2].

В Республике Беларусь для систем водоснабжения основными дезинфицирующими средствами являются хлор и хлорамин (моноклорамин). Последний имеет три легко переходящие друг в друга активные формы. Из них трихлорамин, как наиболее летучий, обладает более сильным токсическим действием. Хлорамин обладает более слабым биоцидным действием по сравнению с хлором, однако имеет более высокую устойчивость к разложению в водных растворах и обладает пролонгированным действием. Токсическое действие хлорамина связана с его способностью легко проникать через биопленку и инактивировать прикрепленные микроорганизмы активного ила. Исследования, проведенные сотрудниками Мосводоканала, показали, что при остаточной концентрации свободного хлора в сточной воде не более 0,45 мг/дм³ снижалось количество сапрофитных бактерий до 500 кл/см³ за 4 часа. Увеличение концентрации активного хлора свыше 0,5 мг/дм³ приводило к полному обеззараживанию воды и, как следствие, прекращению процессов самоочищения на период более суток [1, 2, 4, 5].

Цель исследования – изучение эффективности применения препарата «Бионейт» для утилизации хлорамина в водных растворах.

В работе использованы следующие концентрации хлорамина: 80 мг/дм³ (образец № 1) и 400 мг/дм³ (образец № 2). Препарат «Бионейт» вносился в модельные сточные воды в концентрации 5 %. Общий титр клеток препарата составлял $4,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. С целью избежания эмиссии летучих соединений эксперимент проводился в модельных установках закрытого типа при темпе-

ратуре 28 °С. Определение остаточного свободного хлора, моно- и дихлораминов выполняли по модифицированной методике Пейлена [6]. Остаточный общий хлор определялся как в водном растворе, так и в воздухе. Одометрические исследования проводили методом ольфактометрии [7].

Исходные растворы характеризовались ярко выраженным запахом хлора, вызывали рефлекторную реакцию, интенсивность запаха по шкале Райта составляла 5 баллов. В ходе одометрических исследований через одни сутки зафиксировано отсутствие эмиссии хлора для образца № 1. К этому времени в образце № 2 улавливался слабый запах хлора, не вызывающий негативной рефлекторной реакции, интенсивность запаха составляла 2 балла. Содержание остаточного суммарного хлора (моноклорамин, дихлорамин, свободный хлор) снизилась более чем в 10 и 7 раз для образцов № 1 и № 2 соответственно. К концу 3-х сут в пробах, содержащих 80 мг/дм³ хлорамина, запах хлора не отмечался, хлорсодержащие соединения не определялись. В пробах с исходной концентрацией хлорамина 400 мг/дм³ степень очистки от хлорсодержащих соединений составила 99 %.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлена высокая сорбционная и деструктивная активность микробного препарата «Бионейт» в отношении хлораминов. Микроорганизмы, входящие в состав препарата, способны не только выдерживать высокие концентрации хлорамина, но и осуществлять их утилизацию, что является весьма перспективным для их дальнейшего использования в технологиях очистки сточных вод, осложненных содержанием хлорсодержащих дезинфицирующих средств.

Список использованных источников

1. Долина, Л. Новые методы и оборудование для обеззараживания сточных и природных вод / Л. Долина. – Днепропетровск : Континент, 2003. – 139 с.
2. Обеспечение экологической безопасности на объектах коммунального хозяйства: экологические биотехнологии / Ю.Н. Стукалина [и др.] // ИСВП. – 2020. – № 3 (33). – С. 31–34.
3. Драгинский, В.Л. Образование токсичных продуктов при использовании различных окислителей для очистки воды / В.Л. Драгинский, Л.П. Алексеева // Водоснабжение и санитарная техника. – 2002. – № 2. – С. 9–12.
4. Влияние УФ-излучения на трансформацию моно- и дихлораминов в воде плавательных бассейнов в натуральных испытаниях и в эксперименте / З.И. Жолдакова [и др.] // Гигиена окружающей среды. – 2020. – Т. 99, № 3. – С. 230–234.
5. Совершенствование требований к контролю за применением хлорсодержащих средств обеззараживания воды / З.И. Жолдакова [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2019. – Т. 12 (321). – С. 30–34.
6. ГОСТ 18190-72. Вода питьевая. Методы определения содержания остаточного свободного хлора. – М. : Стандартинформ, 2009. – 7 с.
7. Райт, Р. Наука о запахах / Р. Райт. – М. : Мир, 1966. – 225 с.

Место биотехнологий при защите леса от майского хруща

Гниненко Ю.И., Цуканов Я.В., Алпацкая Ю.И., Галич Д.Е., Банникова О.

*Всероссийский научно-исследовательский институт
лесоводства и механизации лесного хозяйства, Пушкино, Россия,
электронный адрес: gninenko-yuri@mail.ru*

Восточный майский хрущ *Melolontha hippocastani* Fabricius, 1801 (Coleoptera, Scarabeidae) давно известен как один из самых опасных и широко распространённых вредителей леса. Его жуки повреждают листву в кронах многих лиственных пород, а личинки, питаясь корнями, уничтожают искусственные молодняки.

Ранее из-за повреждений личинками хруща ежегодно погибали искусственные посадки сосны на многих тысячах гектаров как в европейской части России, так и в Сибири [1, 2]. В середине XX века благодаря принятым мерам защиты вредоносность хруща стала сокращаться, и к концу столетия он перестал представлять угрозу для создаваемых лесных культур [3–5].

Однако ослабление внимания к этому вредителю в последние десятилетия привело к тому, что в настоящее время вновь началось увеличение его численности. Появились сведения о формировании очагов его массового размножения [6] в ряде регионов страны.

Ранее для защиты от хрущей применяли следующие основные меры:
затравливание почвы пестицидами перед посадкой культур;
предпосадочная обработка корневых систем пестицидами;
уничтожение жуков пестицидами во время прохождения ими питания в кронах лиственных пород.

При проведении таких работ использовали самые различные химические пестициды как наземным, так и авиационным способами [7]. В настоящее время в Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории Российской Федерации, нет пестицидов, разрешенных для лесных условий. Также нет и успешно апробированных технологий проведения защитных обработок. Поэтому в настоящее время необходимо практически заново приступить к разработке системы защиты лесных культур от майского хруща.

В основу новой системы должен быть положен другой принцип защиты: вместо повсеместного и массированного применения ядохимикатов, как это практиковалось в XX веке, необходимо предусмотреть максимально возможное применение биологических средств. Однако в настоящее время в арсенале средств защиты от хруща нет надёжных биологических препаратов.

Ранее для борьбы с хрущом неоднократно пытались применять препараты на основе энтомопатогенных грибов.

Имеется небольшой опыт применения нового микрокапсулированного комплексного грибного препарата, но требуется завершение его испытания и разработка технологии его применения.

Приступая к созданию системы биозащиты лесов от майского хруща, следует иметь в виду, что в настоящее время, скорее всего, не удастся проводить обработки лиственных лесов в местах обитания жуков. Но есть возможность, пока развитие очагов ещё не привело к угрозе массовой гибели искусственных посадок леса на больших площадях, провести испытания новых биологических средств на основе эффективных энтомопатогенных микромицетов, а также нематод. Внесение таких средств, скорее всего, будет наиболее эффективным путём предпосадочной обработки корневых систем непосредственно во время высадки семян и саженцев на лесокультурные площади.

Список использованных источников

1. Холодковский, Н.А. Курс энтомологии теоретической и прикладной / Н.А. Холодковский. – М. ; Л. : Гос. изд-во, 1929. – Т. 2. – 398 с.
2. Наставление по борьбе с майским хрущом в лесах водоохранной зоны. / Главное управление лесоохраны и лесонасаждений при СНК СССР. – М., 1938. – 27 с.
3. Павлинов, Н.П. Восточный майский хрущ в лесах РСФСР и неотложные мероприятия по борьбе с ним / Н.П. Павлинов // Борьба с восточным майским хрущом : материалы к науч.-техн. совещ., 17–20 авг. 1971 г. – Пушкино : ВНИИЛМ, 1971. – С. 31–34.
4. Трошанин, П.Г. Хрущи и борьба с ними в лесном хозяйстве / П.Г. Трошанин. – М. : Лесная промышленность, 1966. – 160 с.
5. Нефедьев, А.А. Опыт создания лесных культур на захрущевленных площадях в Марийской АССР / А.А. Нефедьев // Борьба с восточным майским хрущом : материалы к науч.-техн. совещ., 17–20 авг. 1971 г. – Пушкино : ВНИИЛМ, 1971. – С. 25–20.
6. Восточный майский хрущ – несколько забытая, но вновь реальная угроза / Ю.И. Гниненко [и др.] // Лесной вестник / Forestry Bulletin. – 2023. – Т. 27, № 1. – С. 67–74. doi: 10.18698/2542-1468-2023-1-67-74.
7. Троицкий, Б.Г. Химическая борьба с восточным майским хрущом в лесах Поволжья / Б.Г. Троицкий // Борьба с восточным майским хрущом : материалы к науч.-техн. совещ., 17–20 авг. 1971 г. – Пушкино : ВНИИЛМ, 1971. – С. 55–59.

Очистка сточных вод птицеперерабатывающих предприятий с использованием консорциума бактерий рода *Rhodococcus* и *Bacillus*

Губчик К.А., Глушень Е.М., Чирикова М.С., Бирюков Р.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: gubchikk@gmail.com*

Птицеводство является одной из интенсивно развивающихся отраслей сельского хозяйства. Расширение птицеперерабатывающих предприятий сопровождается увеличением объемов отходов, что при отсутствии модернизации очистных сооружений может привести к сбросу сточных вод, не прошедших очистку до требуемых параметров, на очистные сооружения коммунально-бытовых стоков или в окружающую среду и, соответственно, послужить причиной нарушения работы очистных сооружений или загрязнения объектов окружающей среды экотоксикантами [1, 2].

Птицеперерабатывающие предприятия образуют значительные объемы сточных вод, содержащих высокие концентрации загрязняющих органических веществ (растворенные кератины, жиры и белки крови, дезинфицирующие и моющие средства), питательные вещества (азот и фосфор), характеризующихся высокими значениями биологического потребления кислорода (БПК), химического потребления кислорода (ХПК) и взвешенных веществ [2].

При удалении из сточных вод органических загрязнителей весомый вклад вносят экономически и практически эффективные биологические методы [3], в том числе с применением микроорганизмов-деструкторов различных экотоксикантов, обладающих высокой деструктивной активностью, вносимых в очистные сооружения в дополнение биологической популяции активного ила на различных этапах очистки.

В настоящее время на основе консорциумов микроорганизмов уже разработаны и широко применяются биопрепараты для очистки объектов окружающей среды от органических загрязнений. Среди них часто встречаются микроорганизмы родов *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* и др. [4]. Особый интерес вызывают микроорганизмы родов *Rhodococcus* и *Bacillus*, обладающие помимо высокой деструктивной активности способностью синтезировать биосурфактанты – соединения, способствующие повышению биодоступности трудно утилизируемых гидрофобных органических субстратов.

Цель работы – скрининг и изучение свойств микроорганизмов родов *Rhodococcus* и *Bacillus*, способных к деструкции основных загрязняющих веществ сточных вод птицеперерабатывающих предприятий.

Из 145 исследованных штаммов микроорганизмов было выявлено 14 культур, обладающих протеолитической, липолитической активностью, а также способных образовывать биосурфактанты и утилизировать органические соединения сточных вод птицеперерабатывающих предприятий [5]. На основе отобранных штаммов были сформированы консорциумы микроорганизмов, перспективные для комплексной очистки сточных вод птицеперерабатывающих предприятий. Сравнительный анализ деструктивной и флокулирующей активности полученных консорциумов позволил получить наиболее эффективный консорциум на основе штаммов микроорганизмов *B. subtilis* 6/2-АПФ1, *Bacillus* sp. FL-9MV, *R. ruber* 200N, *Bacillus* sp. PF1 и *R. ruber* 1НГ.

Применение данного консорциума для очистки сточных вод птицеперерабатывающих предприятий с исходным ХПК 500–620 мгО₂/л положительно влияло на структуру и окислительную способность активного ила. Отмечено увеличение разнообразия и равномерное распределение между организмами индикаторных групп активного ила, улучшились его деструктивные и седиментационные свойства. Скорость оседания ила увеличивалась в среднем на 10 %, а степень осветления сточных вод составляла 72–90 %. Очистка по взвешенным веществам увеличилась на 14,70 %, по общему фосфору – на 28,72 %, количество ПАВ снизилось на 76,64 %. За счет интродукции микроорганизмов-деструкторов увеличилась окислительная мощность ила, что проявилось в увеличении его дегидрогеназной активности на 9–22 %, степени очистки по ХПК и БПК₅ – на 19,20 и 17,24 % соответственно.

Список использованных источников

1. Васильева, Н.В. Экотоксикологическая оценка воздействия птицеводческих комплексов на окружающую природную среду : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Н.В. Васильева ; Владимир. гос. университет. – Владимир, 2006. – 27 с.
2. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen / A. Ferreira [et al.] // *Environmental Research*. – 2018. – Vol. 164. – P. 32–38.
3. Бекбаулина, Н.С. Очистка сточных промышленных вод биологическим методом / Н.С. Бекбаулина, А.К. Арипова // *Вестн. Актюбин. регион. гос. ун-та им. К. Жубанова. Естественные науки*. – 2018. – № 4 (54). – С. 46–50.
4. Ягафарова, Г.Г. Особенности процесса активации аборигенной микрофлоры для очистки почвы от экотоксикантов / Г.Г. Ягафарова // *Вестн. технол. ун-та*. – 2016. – Т. 19, № 11. – С. 205–207.
5. Перспективы применения микроорганизмов – продуцентов сурфактантов для очистки сточных вод птицеперерабатывающих предприятий / К.А. Губчик [и др.] // *Микробные биотехнологии: Фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2022. – Т. 14. – С. 361–382.

Мультиреспирометрическое тестирование торфяной почвы

Жебрак И.С., Ковальская Е.М.

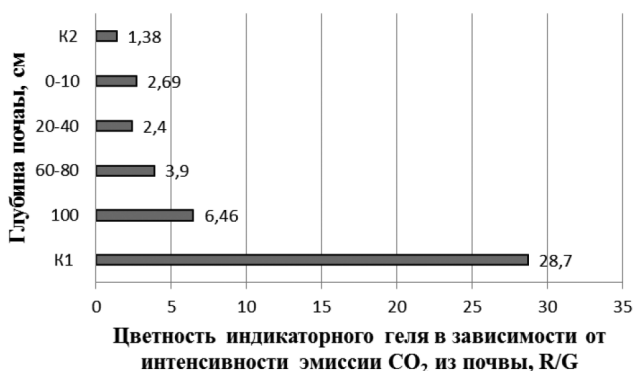
*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь,
электронный адрес: corune@mail.ru*

Торфяные болота во всем мире признаются одним из наиболее значимых в экологическом отношении и вместе с тем уязвимым типом естественных биотопов. Сложный и многофакторный процесс торфообразования невозможно понять и объяснить, не учитывая деятельность почвенного микробного комплекса, который также выполняет основную работу по поддержанию биосферных процессов. Он является основным компонентом почвенной биоты и выполняет многообразные функции в круговороте веществ. Микробное сообщество – объективный экологический индикатор состояния почвенного биоценоза. К одним из современных методов оценки функционального состояния микробного комплекса почвы относится метод мультиреспирометрического тестирования (МРТ). МРТ основано на анализе показателей дыхания сообщества почвенных микроорганизмов [1]. В данной работе представлены результаты мультиреспирометрического тестирования торфяной почвы, залегающей на разной глубине.

Исследование почвы проводили на верховом болоте, вблизи Чертова озера, которое расположено в 3,5 км от станции Рыбница (РБ, Гродненский район) на территории Республиканского ландшафтного заказника «Озеры». Образцы отбирали из разных горизонтов почвы, на глубине 0–100 см в сосняке березово-багульниково-клюквенно-сфагновом [2, 3]. Почвенный микробный комплекс оценивали методом МРТ по дыхательной активности торфяной почвы. Эксперименты проводили в 24-луночных планшетах. В каждую ячейку планшета объемом 2,2 см³ добавляли 1,5 г торфяной почвы. В качестве первого контроля (К1) использовали пустые ячейки, второй контроль (К2) – дерново-подзолистая пашенная почва. Интенсивность эмиссии CO₂ количественно оценивали фотометрией гелевой индикаторной тест-системы. Для этого крышку планшета заливали агаровым гелем, содержащим бромкрезоловый пурпуровый в фосфатном буферном растворе. После увлажнения почвы до 60 % от полной влагоемкости (ПВ) ячейки планшета герметично закрывали крышкой и инкубировали при 28 °С в течение 10 ч. В зависимости от количества накопившегося в ячейках углекислого газа изменялась оптическая плотность индикаторного геля. Интенсивность окраски геля оценивали методом цветометрии. Для этого крышку планшета сканировали. Сканограммы индикаторного гелевого материала над ячейками планшета анализировали количественно с помощью компьютерной

программы Color Seizer. Цветность индикаторного геля над ячейками выражали относительной величиной R/G (R – красный цвет; G – зеленый). Чем больше выделяется из почвы CO₂, тем ниже показатели цветности R/G и соответственно, меньше численность и разнообразие микробного сообщества [1].

Результаты МРТ показали, что интенсивность выделения углекислого газа в ячейках с почвой значительно выше по сравнению с первым контролем (ячейки без почвы). Самые высокие показатели цветности индикаторного геля наблюдали над ячейкой с почвой, взятой из горизонта на уровне 1 м, наименьший – на глубине 20–40 см. Показатели цветности индикаторного геля над ячейками с торфом были значительно выше по сравнению со вторым контролем (дерново-подзолистая пашенная почва) (см. рисунок).



Результаты мультиреспираторметрического тестирования торфа в слоях на разной глубине (0–10; 20–40; 60–80; 100 см) и дерново-подзолистой пашенной почвы в верхнем горизонте (K2)

Таким образом, в торфяной почве интенсивность эмиссии CO₂ наибольшая в горизонте 20–40 см и постепенно снижается в торфяных отложениях до 1 м. В верхнем горизонте, где преобладал сфагнум, отмечали относительно невысокое выделение углекислого газа. Показатели «дыхания почвы» торфяной почвы значительно меньше по сравнению с дерново-подзолистой почвой, что говорит о бедности почвенного микробного комплекса на болоте.

Список использованных источников

1. Марченко, С.А. Индикация загрязнения почвы стойкими органическими загрязнителями по функциональной реакции микробного сообщества : дис. ... канд. биол. наук: 07.09.08 / С.А. Марченко. – М., 2008. – С. 4–7.
2. Созинов, О.В. Оптимизация оценки урожайности сырья *Ledum palustre* (Ericaceae) на ключевом участке / О.В. Созинов // Растительные ресурсы. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 213–220.
3. Созинов, О.В. Оценка урожайности *Cornus Ledi palustris*: сравнение методик / О.В. Созинов, О.С. Рымша // Материалы конф. «Х Галкинские Чтения», Санкт-Петербург, 4–6 февр. 2019 г. / Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова / Т.К. Юрковская (гл. ред.) [и др.]. – СПб., 2019. – С. 192–193.

Микоризные ассоциации *Ledum palustre* в болотных сосняках

Жебрак И.С., Лещевич А.В.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь,
электронный адрес: corune@mail.ru

Эрикоидная (ЭрМ) микориза обнаружена у вересковых растений и, пожалуй, наименее изучена. Рост вересковых на почвах с очень низким содержанием азота и высокой кислотностью, наличием ряда факторов, вызывающих стресс растений, говорит о том, что представители ЭрМ способны выживать в неблагоприятных условиях [1]. *Ledum palustre* L. (*Rhododendron tomentosum* Harm.) – вечнозеленый кустарник верховых болот, реликт ледникового периода, бореально-субарктический вид, распространен в заболоченных и сырых сосновых, реже смешанных лесах, на торфяных болотах. *Ledum palustre* – типичный микотрофный вид [2].

Цель работы – определить микосимбиотрофность *L. palustr* L. в разных болотных фитоценозах.

Исследования проведены на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры» (Гродненский и Щучинский районы Гродненской области Беларуси). Модельное болото (болото Чертово с одноименным озером) площадью около 1 км² располагалось в западной части заказника в ЮЮВ окр. д. Рыбница Гродненского района [3]. Корни *L. palustre* выкапывали на пяти пробных площадях (400 м²) в окр. Чертова озера. Фитоценозы, в которых проводили исследования, относятся к багульниковому типу леса (*Pinetum ledosum*), включая следующие ассоциации: L1 – сосняк березово-пушицево-клюквенно-сфагновый; L2 – сосняк березово-багульниково-клюквенно-сфагновый; L9 – сосняк березово-багульниково-клюквенно-сфагновый; L11 – сосняк березово-багульниково-пушицево-сфагновый; L12 – сосняк березово-чернично-сфагновый [4].

В лаборатории корни очищали от почвы, промывали, проводили их мацерацию и окрашивали в растворе анилинового синего [5]. Готовили препараты, помещая на предметное стекло 15 фрагментов корней (размером 1 см). Всего было сделано 125 препаратов корней *L. palustre* из 25-и растений из пяти пробных площадей. Для оценки микотрофности *L. palustre* использовали метод Селиванова [5]. Определяли частоту встречаемости микоризной инфекции (F, %), интенсивность микоризации (С, %) и степень микотрофности (D, баллы).

Эрикоидные микоризные грибы обнаружили в самых тонких конях в клетках ризодермы, в виде завитков гиф. Реже внутри коня выявляли темноокрашенный мицелий. Встречались корни на 90 % колонизированные микобионтом. Наружный светлый септированный и темноокрашенный септированных

мицелий микоризных грибов встречался редко и был слабо развит, в большинстве своем располагался на поверхности корня.

Микосимбиотрофность *L. palustre* в пяти исследуемых фитоценозах варьировала: частота встречаемости эрикоидных грибов (F) составляла 25–63 %, интенсивность микоризации (С) – 13–32 %, степень микотрофности (D) – 0,45–1,5 балла (см. таблицу).

Показатели микосимбиотрофности *L. palustre*

Кодировка фитоценозов	Частота встречаемости ЭрМ грибов (F, %)	Интенсивность микоризации (С, %)	Степень микотрофности (D, балл)
L1	24,9 ± 2,3	13,3 ± 1,3	0,45 ± 0,06
L2	28,9 ± 2,3	16,8 ± 1,4	0,64 ± 0,05
L9	41,8 ± 3,9	21,8 ± 1,8	0,87 ± 0,87
L11	58,2 ± 3,8	29,3 ± 2,3	1,2 ± 0,12
L12	62,9 ± 3,2	32,2 ± 2,7	1,5 ± 0,15

Таким образом, во всех исследуемых пяти болотных фитоценозах в корнях *L. palustre* выявлены ассоциации микоризных грибов степень развитие которых варьировала в широком диапазоне в зависимости от места произрастания растения.

Список использованных источников

1. Брындина, Л.В. Микоризные грибы в формировании биогеоценозов: аналитический обзор / Л.В. Брындина, Ю.И. Арнаут, О.И. Аликова // Лесотехнический журнал. – 2022. – № 1. – С. 5–20.
2. Сезонные изменения в развитии микоризы *Rhododendron tomentosum* Harm. на территории украинского полесья / Н.Ю. Белова [и др.] // Ботаника (исследования). – 2014. – Вып. 43. – С. 148–153.
3. Созинов, О.В. Оптимизация оценки урожайности сырья *Ledum palustre* (Ericaceae) на ключевом участке / О.В. Созинов // Растительные ресурсы. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 213–220.
4. Созинов, О.В. Оценка урожайности *Cornus Ledi palustris*: сравнение методик / О.В. Созинов, О.С. Рымша // Материалы конф. «Х Галкинские Чтения», Санкт-Петербург, 4–6 февр. 2019 г. / Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова ; Т.К. Юрковская (гл. ред.) [и др.]. – СПб., 2019. – С. 192–193.
5. Бетехина, А.А. Микротехнические исследования на базе современного оборудования руководство к практическим занятиям / А.А. Бетехина, И.А. Уткина. – Екатеринбург : Урал. гос. ун-т им. А.М. Горького, 2008. – 110 с.

Биотехнологический потенциал новых почвенных изолятов — высокоэффективных деструкторов нефти и фенола

Иминова Л.Р.^{1,2}, Поливцева В.Н.²

¹Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуццино, Россия

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

ФИЦ ПНЦБ РАН, Пуццино, Россия,

электронный адрес: uzdleila90@gmail.com

Одними из наиболее токсичных соединений, загрязняющих природные объекты, являются нефть, фенол и его хлорированные производные. Углеводороды нефти относятся к широко распространенным поллютантам поверхностных и подземных экосистем. Помимо загрязнения сырой нефтью регистрируется загрязнение продуктами ее переработки, особенно в районе городов и крупных предприятий. Для ликвидации последствий техногенного загрязнения окружающей среды широко применяются биологические методы. Аналитические данные, полученные в процессе исследования, позволили определить, что бактерии родов *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Fictibacillus*, *Mesobacillus* и *Exiguobacterium* способны к деградации токсичных соединений с высокой скоростью при высокой солености очищаемой среды и широком диапазоне температур.

Методом накопительного культивирования из образцов загрязненных и незагрязненных земель были выделены изоляты, способные к деструкции фенола, хлорфенолов и углеводородов нефти. Выделенные культуры прежде всего были проверены на способность использовать эти соединения в качестве единственного ростового субстрата в минеральной среде при концентрации в среде фенолов от 0,1 до 3,0 г/л и нефти 1–2 %. Рост культур и определение активности ферментов изучали спектрофотометрически (спектрофотометр UV-1800, «Shimadzu», Япония): оптическую плотность детектировали при длине волны 590 нм, присутствие фенола контролировали, снимая спектры в диапазоне 220–350 нм. Для наиболее активных изолятов было определено их филогенетическое положение методом секвенирования гена 16S рРНК. Определена активность ключевых ферментов деградации поллютантов. У ряда штаммов обнаружена активность пирокатехин-1,2-диоксигеназы (ПК-1,2-ДО), составившую 0,08–0,16 ед/мг. Особенностью штамма 7В была высокая активность протокатехоат 3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО), которая в бесклеточном экстракте в 15 раз превышала активность ПК-1,2-ДО. Индукция ПКК-3,4-ДО может свидетельствовать о том, что процесс деградации фенола идет преимущественно с образованием протокатехоата, что в целом не часто встречается у бактерий. Возможна также множественность путей деградации ароматических соедине-

ний у бактерий, которые не были адаптированы к росту на целевых субстратах в течение длительного периода. Активность муконатциклоизомеразы (МЦИ) была также обнаружена в бесклеточном экстракте штамма 7В и составила в среднем 0,07 ед/мг белка. Для наиболее активных изолятов была определена способность наращивать биомассу при повышенной солености среды в широком диапазоне температур (от 25 до 50 °С). В ходе исследования было показано, что штамм *Rhodococcus* sp. 7В способен к утилизации фенола в концентрации 2 г/л и нефтепродуктов в концентрации до 2 %, при 10 % солености среды при температурах от 28 до 45 °С. Штамм *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex1 активно деградирует углеводороды при 28 °С и солености 11 %. Процент убыли нефтепродуктов в образцах, обработанных исследуемыми штаммами, составил от 34,5 до 51 % за 15 сут соответственно. Штамм *Rhodococcus* sp. 7Ва растет на феноле в концентрации до 1 г/л, а также на хлорфенолах: 4-хлор, 2,4-дихлор и 2,4,6-трихлорфенолах в концентрации до 0,1 г/л, штаммы *Acinetobacter* sp. Fch 5/2, *Fictibacillus* sp. VMI-2 и *Mesobacillus* sp. VMI-11 способны к утилизации фенола в концентрации до 2 г/л, а также 4-хлорфенола (4ХФ) до 0,1 г/л.

Исследование позволило выделить бактерии-деструкторы токсичных соединений не только из ранее загрязненных природных объектов, но и из «чистых» почв, а также показало перспективу их использования для создания биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды от токсичных загрязнителей в широком диапазоне температур при высокой солености очищаемой среды.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00590.

Бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов – деструкторов нефтяных углеводородов

Клишевич Н.Г., Самсонова А.С., Картыжова Л.Е.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: natal.kl@rambler.ru

Регулярные мониторинговые исследования, выполняемые на территории Беларуси, выявляют широкое распространение и высокие уровни загрязнения почв нефтепродуктами. Содержание нефтепродуктов при этом отличаются значительной вариабельностью: от фоновых (менее 5 мг/кг) до ураганных (более 100 000 мг/кг) значений при аварийных разливах нефтепродуктов. Длительный процесс естественного восстановления загрязненной нефтью почвы требует вмешательства человека. Ускорение этих процессов в настоящее время осуществляется с помощью углеводородоокисляющих микроорганизмов. В связи с этим скрининг микроорганизмов-деструкторов является актуальным направлением исследований в настоящее время.

Цель исследования – выделение активных углеводородоокисляющих микроорганизмов, обеспечивающих ускорение процессов биодegradации загрязненной нефтью почв.

В период 2010–2012 гг. из загрязненной нефтью дерново-подзолистой почвы РБ было выделено 317 углеводородоокисляющих микроорганизмов и 44 ассоциации бактерий – деструкторов нефти. В результате проведенных лабораторных исследований отобрана ассоциация БП 1, представленная двумя изолятами, идентифицированными как *Bacillus amyloliquefaciens* БП 1.1 и *Gordonia alkanivorans* БП 1.2, устойчивыми к повышенным концентрациям нефтепродуктов (10–100 %), соли (5–15 %), окисляющими ароматические углеводороды в мета-положении, обладающие ростстимулирующей активностью (более 25 %); штамм *B. amyloliquefaciens* БП 1.1 синтезирует β-ИУК в количестве 7,2 мкг/мл. Установлено, что отобранные штаммы активно развивались в жидкой среде Е-8, содержащей мальтозу (1 % w/v). Стартовая оптическая плотность бактериальных суспензий штаммов *B. amyloliquefaciens* БП 1.1 и *G. alkanivorans* БП 1.2 составляла 0,03 усл. ед. и 0,048 усл. ед., что соответствовало 0,22 и 0,36 г/л сухого веса бактериальной массы. Через 7 сут культивирования ОП₆₇₀ культуральной жидкости штаммов *B. amyloliquefaciens* БП 1.1 и *G. alkanivorans* БП 1.2 возрастала до 0,72 усл. ед. (5,28 г/л) и 0,34 усл. ед. (2,49 г/л). На основании полученных данных можно заключить, что отобранные штаммы являются устойчивыми к углеводородам нефти и активно их используют в качестве единственного источника углерода. Для проверки эффективности углеводородоокисляющей ассоциации БП 1 был заложен полевой

опыт в Гомельской области на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве. В схему опыта вошли следующие варианты: контроль (без нефти), почва с 1 %/м² нефти, почва с 1 %/м² нефти и препарат Родобел-ТН, почва с 1 %/м² нефти и композицией (Родобел-ТН и ассоциация БП 1). Эффективность ассоциации БП 1 определялась на фоне применения препарата-аналога Родобел-ТН и при совместном с ним использовании.

Перед внесением углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненную почву производилось одновременное внесение комплексных минеральных удобрений и доломитовой муки (для поддержания pH от 7,5 до 7,8), рыхление почвы на глубину 20 см. Биологическую активность дерново-подзолистой почвы определяли через 1 и 3 месяца после закладки опыта. В результате проведенных лабораторных и полевых опытов установлено, что применение углеводородокисляющих микроорганизмов (препарат Родобел-ТН и композиция Родобел-ТН с ассоциацией БП 1) стимулирует почвенную микробиоту. Общая численность микроорганизмов почвы через 3 месяца после закладки опыта в варианте с нефтью и внесенным препаратом Родобел-ТН возрастает по сравнению с контрольными вариантами в 4,6 (без нефти) и 1,7 раза (с нефтью), в варианте при совместном применении Родобел-ТН и ассоциации БП 1 на загрязненной нефтью почве – в 11,3 и 4,18 раза соответственно. Максимальная биогенность почвы установлена в варианте (Родобел-ТН с ассоциацией БП 1), которая составила $362,46 \cdot 10^6$ КОЕ/г а. с. п. Активность фермента дегидрогеназы в почве, загрязненной нефтью, при применении микробной композиции (Родобел-ТН с ассоциацией БП 1) превышала в 1,4 раза (0,96 ТФФ, мг/10 г почвы) показатели, полученные без использования углеводородокисляющих микроорганизмов. Таким образом, можно заключить, что применение углеводородокисляющей ассоциации БП 1 и ассоциации БП 1 совместно с препаратом Родобел-ТН ускоряет процессы деградации углеводородов нефти и способствуют восстановлению биологической активности дерново-подзолистой почвы. В связи с этим углеводородокисляющая ассоциация БП 1 может быть использована в качестве обогащения микробного препарата Родобел-ТН для обеспечения ускорения процессов восстановления биологической активности почвы.

Список использованных источников

1. Самсонова, А.С. Биосорбционный препарат Родобел-ТН: состав, эффективность применения / А.С. Самсонова, Н.Г. Клишевич // МНО «Интер-медикал». – 2014. – № 4. – С. 63–67.
2. Клишевич, Н.Г. Влияние нефтяного загрязнения на биологическую активность дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы / Н.Г. Клишевич, Л.Е. Картыжова // The scientific heritage. – 2022. – Vol. 1, № 85. – С. 7–15.
3. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils / S. Khan [et al.] // Chemosphere. – 2013. – Vol. 90, № 4. – С. 1317–1332.

Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов из почв антропогенных зон

Косимов Д.И., Зайнитдинова Л.И., Лазутин Н.А., Жураева Р.Н.,
Мавжудова А.М., Эргашев Р.Б., Хегай Т.Б.

*Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: zajn-lyudmila@yandex.ru*

Почва является основным компонентом наземной экосистемы, функционирование которой во многом обеспечивается почвенным микробиомом. Исследователи всех стран направлены на получение обширной информации об особенностях функционирования почвенного микробиома в городских условиях. Рост городов всегда сопровождается усилением антропогенного воздействия на экосистемы, и наиболее ярко эти изменения отражаются на почвах как базовом их компоненте. Урбанизация приводит ко множеству последствий для почвенного покрова. Различного рода загрязнения оказывают большое влияние на изменение структуры микробиома. В связи с этим нами проведено изучение состава микроорганизмов в условиях города и на территории очистных сооружений города, куда сбрасываются стоки, имеющие самые различные как органические, так и неорганические загрязнения. В процессе обследования показана динамика изменения микробных сообществ в зависимости от степени антропогенной нагрузки, температуры и влажности исследуемых образцов почв. Состав микробиоценозов включает в себя широкий спектр организмов – от энтеробактерий до свободноживущих азотфиксаторов и сульфатредукторов. Выявлены представители различных групп микроорганизмов, свидетельствующие о той или иной степени загрязнения почвы.

Несмотря на отрицательное воздействие на функционирование микробиома антропогенно-нарушенных почв, они могут служить важным источником для получения микроорганизмов с широким биотехнологическим потенциалом. Загрязнения различного рода и сложные условия определяют появление более устойчивых микроорганизмов, обладающих уникальными свойствами, в том числе деградирующей способностью. Так, в процессе обследования выделены штаммы, обладающие такими уникальными способностями. Один из полученных штаммов – *Ochrobactrum intermedium* PDB-3 охарактеризован и проведена его молекулярно-генетическая характеристика. Данный штамм показал высокую активность как в деградации пестицидов хлорпирифос и циперметрин, так и ростстимулирующее действие при обработке семян пшеницы. Показано, что деградация хлорпирифоса за 30 сут составляет 82,6 и 100 % в случае циперметрина. Также показано стимулирующее действие штамма *Ochrobactrum intermedium* PDB – 3 на всхожесть семян пшеницы до 95,7 %.

Кроме того, недавно была выявлена способность бактерий рода *Ochrobactrum* к образованию азотфиксирующих клубеньков на корнях растений, что открывает достаточно широкие перспективы для его широкого применения.

Таким образом, знания о физиологии и экологии таких микроорганизмов и условиях их успешной интродукции в природные экосистемы позволят разработать эффективную систему биодegradации для развития экологической биотехнологии.

Список использованных источников

1. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium* / A. Ngom [et al.] // Gen. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol. 50, № 1. – P. 17–27.
2. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. / M.E. Trujillo [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 3. – P. 1318–1327.

Разнообразие архей в почвогрунтах, загрязнённых лигнинсодержащими отходами

Кочаровская Ю.Н.¹, Богун А.Г.², Демин Д.В.^{3,4}, Севостьянов С.М.³,
Делеган Я.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
ФИЦ ПНЦБ РАН, Пуцино, Россия, электронный адрес: kocharovskayaj@mail.ru

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии», Оболенск, Россия, электронный адрес: bogun@obolensk.org

³ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН),
Пуцино, Россия, электронный адрес: nimedd@yandex.ru

⁴ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»,
Россия, электронный адрес: nimedd@yandex.ru

За более чем 40 лет деятельности Байкальский целлюлозно-бумажный комбинат накопил около 6,2 млн т отходов, в том числе 2,6 млн т шлам-лигнина, основная масса которого складирована на Солзанском полигоне, расположенном на берегу озера Байкал.

В связи со сложной аморфной структурой лигнина его деградация невозможна микроорганизмом-монокультурой. Необходимо воздействие или аборигенного микробного сообщества, или консорциума, введённого извне, или и того и другого сразу. Цель работы – исследовать разнообразие архей в аборигенном микробном сообществе, сформировавшемся в почвогрунтах, загрязнённых лигнинсодержащими отходами, и проанализировать изменения, происходящие внутри сообщества при использовании технологии компостирования.

В работе использовали 4 образца шлам-лигнина, отобранные на участке на территории хранилищ-карт на побережье Байкала Иркутской области, заполненных отходами Байкальского целлюлозно-бумажного комбината. Секвенирование полных метагеномов выполняли на оборудовании MGI G400, результаты представлены в таблице.

Во всех образцах, кроме 1.1, структура архейного сообщества похожа. Доминируют *Euryarcheota* (66–79 % всех архей) и археи ТАСК-группы. «ТАСК» – это групповое обозначение *Thaumarchaeota* (сейчас *Nitrososphaerota*), *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* (сейчас *Thermoproteota*) и *Korarchaeota*. Археи ТАСК-группы составляют 17–25 % всех архей.

В образце 1.1 *Euryarcheota* составляют только 52 % всех архей, зато археи ТАСК-группы – 41 %. Возможно, это связано с тем, что условия в грунте образца 1.1 являются более благоприятными для представителей ТАСК-группы, чем в грунте других образцов.

Количество сырых прочтений в образцах до и после предобработки (Quality Control)

Образцы	Описание образца	Пар прочтений до QC	Пар прочтений после QC
1.1	С территории, которая долгое время находилась под водой, но в недавнем времени была осушена	167 653 569	154 304 333
4	С края хранилища-карты, который зарос аборигенной растительностью	159 028 729	149 198 955
5.1	Почвогрунт на основе образца 1.1, полученный в модельном эксперименте с применением твердофазной ферментации	114 816 854	106 287 866
8.1	Почвогрунт на основе образца 1.1, полученный в модельном эксперименте с применением твердофазной ферментации	66 084 212	63 183 758

Состав TACK-группы в образцах неоднородный. По составу TACK-группы образцы можно объединить следующим образом:

1) 1.1 – доминируют *Thaumarchaeota* (72 % TACK-группы, 29 % всех архей). *Crenarchaeota* составляют 13 % TACK-группы и 5 % всех архей;

2) 5.1, 8.1 – *Crenarchaeota* составляют 44–51 % TACK-группы, *Thaumarchaeota* – 26-29 %;

3) 4 – *Crenarchaeota* составляют 40 и 51 % TACK-группы, соответственно. *Thaumarchaeota* – 19–20 %. Также значительную долю (35 %) составляют *Bathyarchaeota* (прежнее название – Miscellaneous Crenarchaeotal Group, MCG) – разрозненный филум, представители которого типичны для морских осадочных пород.

Установлено, что в процессе твердофазной ферментации в почвогрунте увеличивается количество представителей *Euryarchaeota*. В геномах этой группы архей обнаружены гены, потенциально вовлечённые в процесс деструкции компонентов лигнина, что позволяет предполагать участие *Euryarchaeota* в утилизации загрязнителя. Изменение соотношений компонентов архейного микробиома в почвогрунтах позволяет отслеживать комплексные реакции этих микроорганизмов в ходе ремедиационных мероприятий и подбирать условия, способствующие активизации процесса деструкции лигнинсодержащих отходов.

Применение адаптивной лабораторной эволюции в изучении микроорганизмов – биодеструкторов полиэтилентерефталата

Кузьмицкая А.А., Тихонова П.С., Калёнов С.В.

Факультет биотехнологии и промышленной экологии,
Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,
Москва, Россия,
электронный адрес: kuzmichwolf@gmail.com

Синтетические полимерные материалы являются неотъемлемой частью жизни современного человечества, и количество производимого пластика на Земле огромно. Так, с 1950 по 2017 г. в мире было произведено 9,2 млрд т пластиковых отходов, что составляет более тонны отходов на каждого человека на планете. И только 600 млн т из них были переработаны [1]. Необходимо развивать эффективные и экологически безопасные методы утилизации и переработки образующихся полимерных отходов. Одним из самых интересных и перспективных направлений в этой области является биodeградация.

В ходе скрининга сообществ микроорганизмов пойменных биотопов, загрязнённых ПЭТФ-отходами, был выделен бактериальный консорциум, представленный грамположительными и грамотрицательными палочковидными клетками. Результаты секвенирования фрагментов гена 16S рРНК показали, что данный консорциум включает в себя два штамма генетически наиболее близких к видам *Microbacterium aurum* (грамположительные, неподвижные, аэробные палочковидные клетки неправильной формы, образующие колонии жёлтого цвета) и *Brevundimonas bullata* (граммотрицательные, подвижные, аэробные палочковидные клетки, образующие слизистые полупрозрачные колонии белого цвета).

Попытки выделения монокультуры *M. aurum* показали, что *B. bullata* и *M. aurum* связаны между собой определёнными метаболическими взаимодействиями, так как их крайне затруднительно изолировать друг от друга классическими методами. Высевы сообщества на твёрдые питательные среды, содержащие стерильный порошок ПЭТФ в качестве единственного источника углерода, позволили установить, что наиболее вероятным микроорганизмом-биодеструктором ПЭТФ является *M. aurum*.

Чтобы увеличить численность клеток *M. aurum* в сообществе и интенсифицировать энзиматическую активность этой культуры в отношении сложных полимерных субстратов, использовалась жидкая питательная среда, содержащая крахмал и дрожжевой экстракт, в качестве источников углерода, и хлорид аммония в качестве источника азота (рН 7, 28 °С). Через каждые 12 сут культивирования на качалке (150 об/мин, 28 °С) в течение нескольких месяцев

осуществлялись последовательные пересевы бактериального сообщества с постепенным снижением концентрации дрожжевого экстракта в среде.

Через 7 циклов последовательных пересевов, консорциум в виде жидкого инокулята был высеян на твёрдую питательную среду того же состава, но содержащую вместо крахмала небольшие фрагменты стерильного ПЭТФ (пластик полуинтегрирован в агар). Уже через сутки наблюдался видимый рост исследуемого бактериального сообщества. Культура *M. aurum* ассоциирована с пластиковыми частицами и размножается наиболее активно в их окружении (см. рисунок). Адаптированный к подобным сложным субстратам инокулят можно использовать для дальнейшего культивирования в жидких питательных средах и изучения процессов гидролиза полиэтилентерефталата.



Культура *Microbacterium aurum* в сообществе с *Brevundimonas bullata* на питательной среде с частицами ПЭТФ (через 1 сут после засева)

Список использованных источников

1. Microstructural and Thermal Behaviour of Composite Material from Recycled Polyethylene Terephthalate and Fly Ash / N.H. Mohd Nasir [et al.] // Recycling. – 2023. – Vol. 8, № 1. – P. 11.

Биодеградация линейных полиакриламидов амидазосодержащими бактериями

Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия,
электронный адрес: 19mochalova96@mail.ru*

Полиакриламиды (ПАА) представляют собой группу полимеров на основе акриламида и его производных. ПАА широко применяется в различных областях промышленности и деятельности человека: водоочистке, нефтеперерабатывающей, целлюлозно-бумажной, косметической промышленности, сельском хозяйстве [1]. Полиакриламид считается нетоксичным веществом для растений и животных, однако присутствие мономера в его составе может представлять угрозу загрязнения окружающей среды, а также нанести вред здоровью человека и животных, если деградация полимера будет происходить с высвобождением мономеров [2, 3]. Таким образом, необходимо всесторонне изучать проблему эффективной утилизации этих полимеров. Биодеградация является одним из методов устранения загрязняющих органических веществ. Существуют сведения, которые подтверждают возможность использования ПАА и его производных некоторыми микроорганизмами в качестве источника углерода и/или азота [4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение особенностей роста штаммов, обладающих амидазной активностью, на линейных катионных и анионных полиакриламидах как источниках углерода и/или азота.

В работе были использованы амидазосодержащий штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* ИЛ БИО, выделенный нами ранее из почвы в присутствии поперечно-сшитого ПАА, и *Alcaligenes faecalis* 2, выделенный нами ранее из активного ила очистных сооружений с 3-цианопиридином как единственным источником углерода и азота. В качестве субстратов роста использованы ПАА в концентрации 0,05 и 0,01 %: ПАА Праестол 857, обладающий сильной катионной активностью, и ПАА Праестол 2530, обладающий анионной активностью (получены из Института технической химии УрО РАН, Пермь). Способность бактерий использовать ПАА в качестве источника углеродного, азотного питания или единственного ростового субстрата изучали на жидкой безазотистой минеральной среде. Культивирование проводили в конических колбах объемом 50 в 25 мл среды в течение 5–7 дней на шейкере со скоростью вращения 110 об/мин при температуре 30 °С. Рост бактерий оценивали по изменению оптической плотности культуры, измеренной при длине волны 540 нм.

Выявлено, что *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 могут использовать катионный ПАА Праестол 857 в концентрации 0,05 % как в качестве источника азота или углерода, так и единственного субстрата для роста биомассы. Наибольший рост бактерий наблюдали на среде с данным полимером как источником углерода с дополнительным источником азота, а также как единственным источником углерода и азота. Оптическая плотность культуры ($ОП_{540}$) в конце культивирования достигала 0,240–0,250. Анионный ПАА Праестол 2530 в концентрации 0,05 и 0,01 % амидазосодержащие штаммы бактерий использовали только в качестве источника азота с внесением дополнительного источника углерода. При этом $ОП_{540}$ в конце культивирования *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 не превышала 0,200 и 0,100 соответственно.

Таким образом, бактериальные штаммы, обладающие амидазной активностью, могут деградировать линейные ПАА, используя их в качестве субстрата для роста, и в перспективе могут быть применены для утилизации избытков отработанного полимера.

Список использованных источников

1. Gaytán, I. Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved / I. Gaytán, M. Burelo, H. Loza-Tavera // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 105. – P. 991–1006.
2. Nyssölä, A. Microbial degradation of polyacrylamide and the deamination product polyacrylate / A. Nyssölä, J. Ahlgren // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2019. – Vol. 139. – P. 24–33.
3. Bedade, D.K. Biodegradation of acrylamide by a novel isolate, *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Identification and characterization of the acrylamidase produced / D.K. Bedade, R.S. Singhal // Bioresource Technology. – 2018. – Vol. 261. – P. 122–132.
4. Joshi, S.J. Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives / S.J. Joshi, R. Abed // Environ. Process. – 2017. – Vol. 4. – P. 463–476.
5. Максимова, Ю.Г. Биодegradация полиакриламидов почвенной микрофлорой и штаммами амидазосодержащих бактерий / Ю.Г. Максимова, А.А. Горшкова, В.А. Демаков // Вест. Перм. гос. ун-та. Сер. Биология. – 2017. – Вып. 2. – С. 200–204.

Влияние различных факторов на утилизацию бутилцеллозоля на примере бактерий *Rhodococcus opacus* VOC-14

Наркевич Д.А., Глушень Е.М.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: dasha.narkevich@mail.ru*

Для детального понимания физиологических процессов, метаболических путей и их регуляции у микроорганизмов фундаментальное значение имеет точное измерение параметров роста бактериальной культуры. Несмотря на то, что бактерии являются одними из самых быстро размножающихся организмов на планете, для некоторых видов временной период между делениями клетки составляет от нескольких дней и более. В некоторых случаях быстрое размножение у микроорганизмов может обеспечивать им конкурентное преимущество, особенно в условиях лимитированного количества источников питания и стрессового воздействия среды. Возможность быстрого перехода от состояния покоящихся форм и замедленного метаболизма к активному росту также может выступать в качестве важного селективного преимущества в условиях давления эволюционного отбора [1].

В процессе своей жизнедеятельности микроорганизмы подвергаются воздействию различных химических и физических факторов среды, к которым они вынуждены адаптироваться. К первым относят воздействие противомикробных соединений (таких как биоциды и антибиотики), загрязняющих органических соединений, в том числе растворителей, лекарственных препаратов, компонентов косметической и фармацевтической продукции, пестицидов. К физическим факторам среды относятся критически низкая влажность, осмотическое и гидростатическое давление, изменения температуры и pH, а также излучения (ультрафиолетовое, солнечное, ионизирующее). Известно, что воздействие факторов окружающей среды вносит свой вклад в процессы микробной деструкции сложных органических соединений [2, 3].

Цель исследования – оценка влияния температуры культивирования, pH среды и источников азота и фосфора на активность деструкции бутилцеллозоля штаммом *Rhodococcus opacus* VOC-14. Данный штамм был ранее отобран как один из наиболее перспективных микроорганизмов-деструкторов гликолевых эфиров [4].

Влияние источников азота и фосфора оценивали методом культивирования бактерий на модифицированной среде E-8, где источник азота ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) был заменен на тиомочевину ($\text{CS}(\text{NH}_2)_2$), NaNO_3 или $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. В качестве источников фосфора использовали KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 или их смесь. Предва-

рытельно штамм *R. opacus* VOC-14 культывіравалі пры тэмпературах 20, 24, 28 і 30 °С і рН сроды в дыяпазоне ад 5,0 да 12,0. Далее дэструктыўную актывнасць атрыманых культуральных жідкасцей штамма в адношэнні бутылцеллозольва ацэнівалі пры тэмпературе 10 і 22 °С на 14-е сут.

Найбольшая дэструктыўная актывнасць выяўлена пры культывіраванні штамма пры 35 °С і складала 48,57 % для апытоў па дэструкцыі, праведзеных пры 22 °С. Культывіраванне штамма пры тэмпературах ад 24 °С і вышэ практычна не сказывалася на працэсе утылізацыі бутылцеллозольва пры 10 °С. Ступень дэструкцыі токсіканта пры паніжанай тэмпературе колебалася ад 22,54 да 28,62 %. Паказана, што для росту *R. opacus* VOC-14 аптымальнае значэнне водароднага паказатэля сроды культывіравання яўлялось 8,0. Аднак сам працэс дэструкцыі бутылцеллозольва большэ эфэктывна асудшэствляўся пры прэдварытэльным культывіраванні штамма на сродэ с рН, равным 5,0.

В качэствэ істочніка азота тямочевіна яўлялась большэ прэдпочтытэльнай, так как пры ёе іспользаванні наблідалася большэ высакая ступень утылізацыі токсіканта (49,81 %). Пывышэнне дэструктыўнай актывнасці так же атмечалось пры іспользаванні в качэствэ істочніка фосфора смесі $\text{KН}_2\text{PО}_4$ і Na_2HPO_4 па сравненію со стандартнай сродэ культывіравання Е–8.

В рэзултытае праведзенных іспльодваній падобраны аптымальны састав пытатэльнай сроды і параметры культывіравання штамма *R. opacus* VOC-14 для дасягнення ёго максымальнай дэструктыўнай актывнасці па адношэнню к бутылцеллозольву.

Спсыок іспльодваннх істочннык

1. Environmental and physiological factors affecting high-throughput measurements of bacterial growth / E. Atolia [et al.] // MBio. – 2020. – Vol. 11, № 5. – P. 1–19.
2. Russell, A.D. Bacterial outer membrane and cell wall penetration and cell destruction by polluting chemical agents and physical conditions / A. D. Russell // Science progress. – 2003. – Vol. 86, № 4. – P. 283–312.
3. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* / M. S. Kuyukina, I. B. Ivshina // Biology of *Rhodococcus*. – Springer, Cham, 2019. – С. 231–270.
4. Выдэленне і скрыннг мкроорганізмаў дэструктараў гліколевых эфіраў / Д.А. Наркевч [і др.] // Мкробныя біатэхналогіі: фундаментальныя і прыкладныя аспекты : сб. науч. тр. / Ін-т мкробіалогіі НАН Беларусі. – Мінск : Беларус. навука, 2022. – Т. 14. – С. 382–394.

Выделение бактерий, обладающих комплексом агрономически ценных свойств, для повышения стрессоустойчивости растений при водном дефиците

Наумович Н.И., Ананьева И.Н., Алещенкова З.М., Сафронова Г.В., Федоренчик А.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
электронный адрес: ananeva@mbio.bas-net.by*

Дефицит влаги в почве приводит к нарушению содержания ионов в почве, что влечет за собой повышение концентрации солей в почве, в результате чего создаются гипертонические условия, обуславливающие осмотический стресс, нарушающие баланс питательных веществ и воды, проницаемость мембран и снижающие активность ферментов [1, 2].

Засухоустойчивость растений является результатом многих биохимических и физиологических процессов, позволяющих культурам переносить неблагоприятные факторы среды [3]. В связи с этим особую актуальность приобретает выделение микроорганизмов, способствующих минимизации негативного влияния дефицита влаги на рост и развитие растений, посредством азотфиксирующей и фосфатсольбилизирующей активности, синтеза фитогормонов (индолил-3-уксусная и абсцизовая кислота), осмопротеторов (пролина и бетаина), АЦК-дезаминазной активности и т. д. [4, 5].

Цель исследования – выделение бактерий, обладающих комплексом факторов, повышающих стрессоустойчивость растений при водном дефиците.

Из образцов почвы с дефицитом влаги и засоленной почвы выделили и отобрали 11 изолятов бактерий (ЗП2, ЗП3, ЗП13, СП4, СП5, СП7, СП17, РС1, РС7, РС10 и РК4), способных переносить осмотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрации 7–12 % и условия засухи в средах с водным потенциалом $-0,20$ и $-0,42$ МПа.

В ходе проведенных исследований установили, что из 11 выделенных изолятов 10 (ЗП2, ЗП3, ЗП13, СП4, СП5, СП7, СП17, РС1, РС10 и РК4) были способны к азотфиксации. Их нитрогеназная активность колебалась в пределах $22,5 \pm 3,0$ – $67,5 \pm 0,2$ нМ этилена/фл/сут.

Из всех выделенных засухоустойчивых бактериальных изолятов 6 (ЗП2, ЗП3, СП4, РС1, РС7 и РК4) являлись фосфатсольбилизаторами. Количественная оценка активности растворения фосфатов в жидкой среде, содержащей 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, показала, что максимальное содержание растворенного фосфора в культуральной жидкости изолятов ЗП2, ЗП3 и СП4 к 72 ч культивирования составило $16,6 \pm 0,12$ – $49,9 \pm 1,34$ мкг/мл. Изоляты РС1, РС7, РК4 при росте

на плотной глюкозо-аспарагиновой среде образовывали зоны «галло» диаметром 1,9–17,7 мм.

При проведении дальнейших исследований у изолятов РС1, РС10 и РК4 выявлено наличие фермента АЦК-дезаминазы, активность которой находилась в пределах $43,9 \pm 0,2$ – $90,0 \pm 0,2$ нМ/мг белка/ч.

Все отобранные изоляты обладали способностью продуцировать индол-3-уксусную кислоту в концентрации в диапазоне от $2,0 \pm 0,2$ – $102,0 \pm 0,3$ мкг/мл.

В лабораторном опыте изучено влияние отобранных изолятов на рост и развитие растений редиса розово-красного. Установлено, что энергия прорастания семян редиса при обработке 2%-ной культуральной жидкостью изолятов ЗП2, ЗП3, СП4, РС1, РС7 и РС10 составляла 84–89 % (в контроле 80 %); всхожесть обработанных семян овощной культуры также превышала контроль и находилась в пределах 93–98 % (в контроле 89 %); проростки опытных растений были длиннее контрольных в среднем на 5,3 мм; прибавка сырой/сухой биомассы определена при инокуляции семян изолятами ЗП3 и СП5 (11,3/2,07 и 10,7/0,88 мг/проросток (25/45 и 24/19 %) соответственно).

На основании данных по изучению физиолого-биохимических свойств и результатов MALDI-TOF масс-спектрометрии изоляты ЗП2, ЗП3, ЗП13, СП4, СП5, СП7, СП17, РС1, РС7, РС10, РК4 отнесены к видам *Bacillus megaterium*, *Serratia plymuthica*, *Bacillus amiloliquefaciens* ssp. *plantarum*, *Bacillus pumilus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas koreensis*, *Variovorax paradoxus* и *Pseudomonas kilonensis* соответственно.

Таким образом, отобранные бактериальные штаммы обладают комплексом агрономически ценных свойств и перспективны для использования в растениеводстве с целью повышения стрессоустойчивости растений в условиях засухи.

Список использованных источников

1. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stress in Plants: A Review / H.M. Ahmad [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 875774.
2. Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria / A.E. Fadji [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 962427.
3. Research Progress in the Field of Microbial Mitigation of Drought Stress in Plants / S. Shaffique [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 870–626.
4. Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms / Q. Saeed [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, iss. 19. – Art. 10529.
5. Rhizosphere plant-microbe interactions under water stress / A. Bhattacharyya [et al.] // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2021. – Vol. 115. – P. 65–113.

Биологическое разнообразие микробного сообщества и гены вирулентности *Staphylococcus aureus*, выделенного из молока коров

Никанова Д.А.¹, Артемьева О.А.¹, Колодина Е.Н.¹, Бровко Ф.А.²,
Соколов С.Л.², Зиновьева Н.А.¹

¹ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, г. о. Подольск, пос. Дубровицы, Россия
электронный адрес: dap2189@gmail.com

²ИБХ РАН, Пуцино, Россия

Такое заболевание, как мастит крупного рогатого скота, наносит большой экономический ущерб молочной промышленности, снижает продуктивность животных и ухудшает качество молока и молочной продукции [1]. Понимание причин возникновения мастита и определение возбудителей будет способствовать созданию профилактических мероприятий по снижению заболеваемости высокопродуктивных коров [2].

В настоящей работе мы проанализировали микробиоту молока из каждой доли вымени здоровых и больных маститом коров; провели анализ качества молока с использованием инфракрасного анализатора Milkoscan (FOSS); выделили чистые изоляты *Staphylococcus aureus*, провели анализ антибиотикорезистентности с интерпретацией результатов по EUCAST [3] и идентификацию генов вирулентности с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Пробы молока были отобраны от коров в разных регионах РФ. По ветеринарным и лабораторным данным все образцы были разделены на три группы: здоровые (Н); клинический (М) и субклинический (S) мастит. Общая микробная ДНК выделялась из образцов с помощью набора Milk Bacterial DNA Isolation Kit («Norgen Biotek», Канада) в соответствии с инструкциями производителя. Варибельные области V3–V4 гена 16S рПНК амплифицировались с использованием набора универсальных праймеров. Библиотеку готовили по протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США) и секвенировали (MiSeq 2x250). Аннотирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью ресурса MG-RAST. Для аннотирования была использована база данных GreenGenes (<https://greengenes.secondgenome.com>). Окончательный сравнительный анализ изменения количества ОТЕ (оперативных таксономических единиц) в структурах микробиомов был проведен при помощи программного пакета DESeq2 R [4].

Анализ основного микробиома выявил роды бактерий, включая *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Macroccoccus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Ignavigranum* и *Atopostipes*. В анализируемых образцах *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp. были одними из самых

распространенных родов во всех группах. В частности, *S. aureus* был обнаружен во всех трех группах. Последовательности, принадлежащие к роду *Streptococcus*, были обнаружены в большом количестве только в образцах, полученных из четвертей, у которых SCC превышал 430 000 кл/мл.

На чувствительность к антибиотикам был проанализирован 21 изолят *S. aureus*. В них же мы идентифицировали гены вирулентности: энтеротоксины, энтеротоксиноподобные белки, суперантигеноподобные белки, цитотоксины (включая гемолизины и лейкоцидины), адгезия, иммунное уклонение и эксфолиатины. Все изоляты содержали гены, кодирующие гемолизины (*hla*, *hly*, *hlg* и *hld*). Гены лейкоцидинов, включая *lukE/D* и *lukM/F*, были обнаружены у 80,9 % ($n = 17$) и 4,7 % ($n = 1$) изолятов соответственно, но гены *luk S/F* не были идентифицированы. Гены, кодирующие адгезины, а именно *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*, идентифицированы у 100 % изолятов; а *fnbA* и *fnbB* были идентифицированы у 42,8 % изолятов. Гены *Spa* были характерны для всех изолятов. Так же все изоляты имели гены *eta*, но *etb* и *etc* не были идентифицированы. У восьми изолятов, несущих гены стафилококкового энтеротоксина (*seg* и *sei*) были идентифицированы гены, кодирующие белки устойчивости к антибиотикам: *blaZ*, *ermC*, *aac*, *aph* и *norA*.

Исследования с использованием анализа генома *S. aureus* способствовали всестороннему пониманию эпидемиологии мастита у крупного рогатого скота в центральном регионе РФ.

Список использованных источников

1. Heikkilä, A.M. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling / A.M. Heikkilä, J.I. Nousiainen, S. Pyörälä // J. Dairy Sci. – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 139–150.
2. Best practices for analyzing microbiomes / R. Knight [et al.] // Nat. Rev. Microbiology. – 2018. – Vol. 16, № 7. – P. 410–422.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 10.0, 2020 [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
4. Изменение микробиома молока коров при заболевании маститом / К. К. Фурсова [и др.] // Докл. Рос. акад. наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 497, № 1. – С. 169–174.

Трансформация искусственных и синтетических полимеров аскомицетами

Позднякова Н.Н.¹, Шиповская А.Б.², Бабичева Т.С.², Турковская О.В.¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия, электронный адрес: pozdnayakova_n@ibppm.ru

² Институт химии Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского

Благодаря ценным свойствам полимеры широко применяются в разных отраслях промышленности, в сельском хозяйстве, медицине, в быту и т.д. Производство полимеров развивается в двух направлениях: путем переработки природных органических полимеров в искусственные полимерные материалы и путем получения синтетических полимеров из органических низкомолекулярных соединений. Все увеличивающееся производство и использование подобных материалов неизбежно приводит к их попаданию в окружающую среду. В связи с этим одним из важнейших требований при использовании полимерных материалов является не только их стабильность, но и доступность для деградации микроорганизмами или ферментами *in vivo*. В последнее время широко обсуждается проблема биологической утилизации и возможность рециклинга полимерных материалов [1].

Природные полимеры, такие как целлюлоза, хитин или белки, обычно деполимеризуются путем гидролитического расщепления связей, соединяющих мономеры. Следовательно, можно ожидать, что искусственные полимеры с гидролизуемой основной структурой будут легко биодеградироваться по этому же пути [2].

Грибы, в частности аскомицеты, продуцируют широкий спектр внеклеточных ферментов, включающий гидролазы и оксидоредуктазы, который позволяет им утилизировать природные (хитин, целлюлоза, лигнин, лигноцеллюлоза) [3] и синтетические (полиуретан, полиэтилен, полиамид (нейлон-6), полиэтилентерефталат, полистирол и т.д.) полимеры [4].

Для наших исследований были выбраны аскомицеты, принадлежащие к разным эколого-физиологическим группам: фитопатогенный *Fusarium oxysporum*, энтомопатогенный *Lecanicillium aphanocladii*, ризосферный *Talaromyces sayulitensis* и почвообитающий *Trichoderma harzianum*. В качестве модельных полимеров – искусственный (пленки на основе хитозана) и синтетический (полиэтилентерефталат, ПЭТ). ПЭТ применяется для производства

синтетических волокон, но более известно его использование для получения пластиковых бутылок. Материалы на основе хитозана могут быть использованы как биodeградируемые носители фармацевтических препаратов, для очистки сточных вод, для хроматографической очистки биологически активных соединений, в бумажной промышленности и т.д.

Нами выявлена способность аскомицетов использовать ПЭТ и пленки хитозана в качестве единственного источника углерода и энергии. Микроскопические исследования показали, что мицелий растет не только на поверхности пластинок ПЭТ, но и проникает в них, о чем свидетельствуют морфологические изменения пластика, отсутствующие в абиотическом контроле. Методом сканирующей микроскопии также визуализированы дефекты поверхности пленок хитозана и прикрепившийся к ней мицелий гриба.

Утилизация исследованных полимеров грибами сопровождалось образованием эмульгирующих веществ, предположительно белковой природы.

У всех грибов выявлена активность кутиназы – ключевого фермента деполимеризации ПЭТ, а также ряда оксидоредуктаз, по-видимому, катализирующих окисление образующихся продуктов: пероксидаз – у *F. oxysporum* и *T. harzianum*, пероксидаз и оксидаз – у *L. aphanocladii* и *T. sayulitensis*.

В процессе утилизации хитозана *F. oxysporum* и *T. harzianum* продуцировали внеклеточную гидролазу, что может свидетельствовать, по крайней мере, о частичной деградации/деполимеризации исходной структуры. Начиная со второй недели, утилизация хитозана сопровождается продукцией пероксидазы, которая может участвовать в деградации продуктов деполимеризации исходной молекулы.

Полученные данные вносят вклад в понимание процессов самоочищения природных экосистем от искусственных и синтетических полимеров и могут быть использованы для разработки экологических биотехнологий.

Работа выполнена в рамках темы госзадания № ГР 121 031 700 141-7.

Список использованных источников

1. Soong, Y.-H.V. Recent advances in biological recycling of polyethylene terephthalate (PET) plastic wastes / Y.-H.V. Soong, M.J. Sobkowicz, D. Xie // Bioengineering. – 2022. – Vol. 9. – P. 98.
2. Biodegradability of plastics / Y. Tokiwa [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – Vol. 10. – P. 3722–3742.
3. Wang, X. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification / X. Wang, B. Yao, X. Su // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19. – P. 3373.
4. Kruger, M. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics / M. Kruger, H. Harms, D. Schlosser // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99. – P. 8857–8874.

Применение микроорганизмов, способных к аэробной и анаэробной деградации углеводов для очистки нефтезагрязненных сред

Пономарева А.Л., Еськова А.И.

*Тихоокеанский океанологический институт имени И.В. Ильичева ДВО РАН,
Владивосток, Россия,
электронный адрес ponomareva.al@poi.dvo.ru*

Углеводороды интенсивнее поддаются деструкции микроорганизмами в присутствии кислорода [1], поэтому для эффективного использования большинства из существующих биопрепаратов для деградации нефтезагрязненных почв необходимо высокое содержания кислорода. Данная проблема решается дополнительным перемешиванием грунтов с помощью специальной техники, что существенно удорожает процесс. Также существует проблема утилизации нефтяных загрязнений в глубоких слоях почв.

Однако в местах морских нефте- и газопроявлений доминирует анаэробная деструкция углеводов [2, 3]. Это позволяет сделать предположение, что выделенные из данных сред изоляты могут утилизировать нефть в анаэробных условиях.

Пробы морских донных отложений были отобраны в 2017 и 2018 гг. в рамках рейсов ОР54 НИС «Академик Опарин» и LV81 НИС «М.А. Лаврентьев» в северной части Японского моря на глубинах от 300 до 1000 м. Из 23 проб восстановленного слоя донных отложений было выделено 55 штаммов чистых культур, обладающих способностью к окислению углеводов.

Микроорганизмы выделяли с использованием следующих питательных сред: морская аммонийная среда 1313, морская минеральная среда (Marine salt medium), среда Ворошиловой – Диановой [1952] в модификации.

Доминирующими были представители родов *Pseudomonas* (14 штаммов), *Psychrobacter* (13), *Stenotrophomonas* (11), *Bacillus* (5), *Rhodococcus* (4), к минорным родам относились: *Micrococcus* (1), *Nesterenkonia* (1), *Brevibacillus* (1), *Promicromonospora* (1), *Peribacillus* (1), *Robertmurraya* (1), *Curtobacterium* (1), *Nocardioides* (1).

Из всех выделенных штаммов способностью к деградации углеводов в аэробных и анаэробных условиях обладали 38 штаммов родов: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora*.

В 2021 году на полигоне, расположенном в пригороде г. Артем Приморского края, было проведено исследование эффективности использования изучаемых штаммов в качестве компонентов биопрепарата. Штаммы вносили

в нефтезагрязненный грунт, который не перемешивали. Эксперимент длился 46 дней. В конце эксперимента штаммы *Stenotrophomonas maltophilia* strain POI OP54-42/37-3, *Psychrobacter glacincola* POI LV81-51/330-3 (1), *Pseudomonas* sp. POI LV81-57/379-1 (3), *Brevibacillus nitrificans* POI LV81-19/135 показали наиболее значительное снижение углеводов в почве – от 85 до 98 %.

Список использованных источников

1. Biotechnological potential of Rhodococcus biodegradative pathways / D. Kim [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – Vol. 28, № 7. – P. 1037–1051.
2. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review / D. Ghosal [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1369.
3. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review / J. Xue [et al.] // Curr. Microbiol. – 2015. – Vol. 71, № 2. – P. 220–228.

Биодеградация углеводов родококками: утилизация гексадекана в разном агрегатном состоянии в зависимости от температуры среды

Понаморева О.Н.¹ Лыонг Тхи Мо^{1,2}, Нечаева И.А.¹, Пунтус И.Ф.³,
Сузина Н.Е.³, Филонов А.Е.³

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия,
электронный адрес: olgarpomoreva@mail.ru

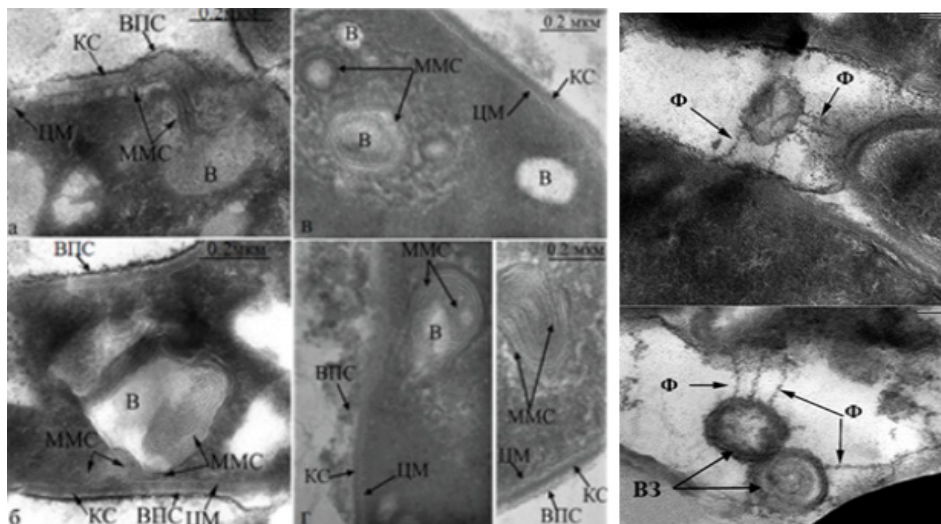
²Российско-Вьетнамский тропический научно-технологический центр
(Южное отделение), Хошимин, Вьетнам

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ ПНЦБ РАН, Пущино, Россия

Цель исследования – выявление особенностей адаптации родококков к деградации гидрофобных углеводов при низкой температуре, когда субстрат находится в твердом состоянии. Описана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* (штаммы X5 и S67, депонированные во Всероссийской коллекции микроорганизмов) к деградации гексадекана (2 % по объёму) при 10°C (твёрдый гидрофобный субстрат) и 26 °C (жидкий гидрофобный субстрат). Несмотря на твердое состояние гидрофобного субстрата при 10 °C, бактерии демонстрируют высокий уровень его деградации (30–40 %) в течение 18 дней [1–3].

Впервые показано, что при деградации гексадекана бактерии рода *Rhodococcus* при низкой температуре образуются специализированные клеточные структуры: внутриклеточные мультимембранные структуры (ММС) преимущественно в виде множественных, уложенных параллельно друг другу мембраноподобных петлевидных или трубчатых образований, как правило, связанные с гидрофобными внутриклеточными включениями (В) (см. рисунок, справа), и поверхностные везикулы (ВЗ), окруженные трехслойной мембраной, соединенные с клеткой электронно-плотными нитями в виде фибриллоподобных структур (Ф) (см. рисунок, слева). Внеклеточные ВЗ могут представлять собой депо гидрофобного субстрата – гексадекана, в виде крупных мицеллярных структур. Внутриклеточные В содержат триацилглицериды в окружении полярных липидов. Это подтверждается данными о низком содержании гексадекана и высоком содержании жирных кислот в составе клеточных липидов. Предположительно, ММС участвуют в транспорте гидрофобного субстрата в клетку, при этом, возможно, происходит его окисление до гексадекановой кислоты под действием мембранлокализованных ферментов, о чем косвенно свидетельствует присутствие гексадекановой кислоты в культуральной среде бактерий. Образование специализированных клеточных структур при выращивании бактерий *Rhodococcus* на твердом гексадекане является важным

адаптивным признаком, способствующим увеличению площади контакта между мембрансвязанными ферментами и гидрофобным субстратом.



Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток бактерий (условия культивирования бактерий: 2 % гексадекан; 10 °С; 6 сут): а, б – штамм S67; в, г – штамм X5. Справа: КС – клеточная стенка; ММС – внутрицитоплазматические мультимембранные структуры; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; В – липидные включения; ВПС – внеклеточные поверхностные структуры. Длина масштабной метки – 0,2 мкм. Слева: видны везикулы (ВЗ), окруженные оболочкой из электронно-плотных слоев, связанные с клетками бактерий с помощью электронно-плотных фибрилл (Ф). Длина масштабной метки – 0,1 мкм

Образование специализированных клеточных структур при выращивании бактерий *Rhodococcus* на твердом гексадекане является важным адаптивным признаком, способствующим увеличению площади контакта между мембран-связанными ферментами и гидрофобным субстратом. Понимание механизмов биodeградации углеводов при низких температурах расширяет понимание фундаментальных аспектов микробного метаболизма.

Список использованных источников

1. Влияние температуры на биodeградацию гексадекана бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 – эффективными продуцентами гликолипидных биосурфактантов / Т.М. Лыонг [и др.] // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 6. – С. 44–53.
2. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature / Т.М. Luong [et al.] // World J. of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 34. – P. 20–29.
3. Hydrocarbons biodegradation by *Rhodococcus*: assimilation of hexadecane in different aggregate states / Т.М. Luong [et al.] // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – P. 1594 (17).

Разработка биологического препарата «ИПСБОВЕР» для защиты хвойных насаждений от стволовых вредителей

Севницкая Н.Л.

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», Гомель, Беларусь,
электронный адрес: n.sevnickaja@tut.by

На протяжении последних десятилетий происходит массовое усыхание еловых и сосновых насаждений в Беларуси. Среди существующих видов стволовых вредителей вершинный *Ips acuminatus* Gyll., шестизубчатый *Ips sexdentatus* Vorn. короеды и короед типограф *Ips typographus* L. самые распространенные в хвойных насаждениях и характеризуются наибольшей вредоносностью.

Несмотря на обширный комплекс методов контроля ксилофагов, развитие патологического процесса в лесных массивах происходит опережающими темпами. Для сохранения повреждаемых насаждений проводится комплекс лесохозяйственных и санитарно-оздоровительных мероприятий, применяются химический и биологический контроль вредителей. Химические средства, используемые против энтомовредителей, оказывают негативное влияние на окружающую среду и растительный мир. В связи с этим представляется актуальным разработать новый отечественный биологический препарат на основе нового штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 20-08, выделенного нами ранее из лесной подстилки в очаге короеда типографа в еловом насаждении Беларуси (Молодечненский лесхоз, Лебедевское лесничество, кв. 163, ельник кисличник) для защиты хвойных насаждений от стволовых вредителей.

Штамм зарегистрирован в Генном банке Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) под идентификационным номером FJ 868 831, получен токсикологический паспорт штамма, согласно которому он не токсичен для человека и теплокровных животных и может использоваться в микробиологическом производстве.

Выделенный штамм достаточно стабилен по морфолого-культуральным признакам. В норме для него является развитие на агаризованных средах округлых колоний желтовато-белого цвета мучнистой, реже пушистой консистенции в зависимости от используемой питательной среды. Штамм при поверхностном росте на жидких питательных средах образует пушистую грибницу. Поверхность колоний белого цвета. Глубинная культура хлопьевидная. Растет при температуре 15–30 °С. Оптимум 26–28 °С.

Отношение к источникам углерода: утилизирует глюкозу, сахарозу, арабинозу, рамнозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, инозит. Слабо развивается на ксилозе, не усваивает целлюлозу, гидролизует крахмал. Отношение к источ-

никам азота: ассимилирует нитраты, аммонийные соли, пептон, дрожжевой экстракт. Хорошо усваивает казеин, альбумин.

Максимальный выход биомассы гриба *Beauveria bassiana* 20-08 на среде Чапека – Докса, Чапека – Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро, картофельно-глюкозном агаре отмечается на 14-е сут роста (см. таблицу).

Продуктивность штамма *B. bassiana* 20-08 на питательных средах

Питательная среда	Продуктивность $n \cdot 10^8$, спор/см ² , спор/мл, $x \pm m$
Чапека – Докса	23,1 ± 0,7
Чапека – Докса + отвар из насекомых	59,3 ± 4,6
Сабуро (твердая среда)	128,6 ± 6,55
Сабуро (жидкая среда)	65,5 ± 2,14
Картофельно-глюкозный агар	30,5 ± 2,9

Пр и м е ч а н и е. *m* – стандартная ошибка среднего значения.

Таким образом, полученный штамм – энтомопатогенный, проявил высокую биологическую активность против жуков короеда типографа, вершинного и шестизубчатого короедов (100 % смертность на 10-е сут лабораторных опытов при титре рабочего раствора $1 \cdot 10^8$ спор/мл). На основе штамма *B. bassiana* 20-08 разрабатывается биологический препарат «ИПСБОВЕР», выращиваемый на пшене. По внешнему виду препарат представляет собой сыпучую споровую массу от белого до бежевого цвета со слабым специфическим запахом и титром спор не менее 5 млрд/г. Препарат поражает насекомых-вредителей в результате действия токсинов при проникновении гиф гриба через покровы. Кроме непосредственной гибели насекомых он снижает жизнеспособность и плодовитость выживших вредителей. Препарат хранят в сухих, защищенных от атмосферных осадков помещениях при температуре не ниже +5 °С и не выше +25 °С. Срок годности 6 мес от даты изготовления.

Получено заключение по токсиколого-гигиенической оценке биопрепарата, согласно которому он не обладает существенными патогенными, токсическими и раздражающими свойствами (IV класс опасности), однако потенциально аллергоопасен при ингаляционном поступлении в организм, что обосновывает необходимость соблюдения мер профилактики при его производстве и применении. На основании результатов выполненных исследований биопрепарат «ИПСБОВЕР» на основе энтомопатогенного гриба штамма *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 20-08 рекомендуется для опытно-промышленного производства и использования согласно инструкции по применению и для постоянной государственной регистрации в Республике Беларусь в качестве биологического средства борьбы со стволовыми насекомыми-вредителями хвойных насаждений.

Перекрестная адаптация микроорганизмов активного ила к УФ-обеззараживанию в условиях оксидативного воздействия

Суворов Д.А., Вакар Л.Л., Кузнецов А.Е.

*Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева,
Москва, Россия,
электронный адрес: dimitriui@mail.ru*

На кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева ранее была разработана технология улучшения показателей биологической очистки сточных вод с использованием активного ила с помощью комбинированного воздействия оксидативного стресса и освещения видимым светом [1]. Технология предусматривает адаптацию активного ила к оксидативному стрессу, возникающему при воздействии пероксида водорода, при одновременном облучении активного ила видимым светом, и получила название технология регулируемого оксидативного воздействия (РОВ-технология). Предполагается, что улучшение показателей очистки при использовании РОВ-технологии с внесением пероксида водорода может наблюдаться и при применении других стресс-факторов вследствие перекрестной адаптации микроорганизмов сообщества активного ила к сублетальным дозам стрессоров [2]. Такая перекрестная адаптация может повышать устойчивость биоценозов ила к различным неблагоприятным воздействиям. При этом в ходе регуляции клеточных процессов в ответ на оксидативный стресс наблюдаются изменения в экспрессии ферментов и синтезе различных соединений [2], что потенциально может положительно влиять на эффективность биологической очистки. Для дальнейшего совершенствования РОВ-технологии требуется ее углубленное изучение. Например, остаются вопросы определения диапазона концентраций пероксида водорода, при которых достигается наилучшие показатели процесса очистки сточных вод, а также вопрос возможного развития устойчивости микроорганизмов к обеззараживанию воды на финишной стадии биологической очистки.

Путем многократного пересева на модельной сточной воде с ХПК 6000 мг/л были получены линии активного ила, адаптированные к различным концентрациям пероксида водорода (0,2, 0,4, 0,6 г/л), а также контрольные линии без его внесения. Адаптированность к пероксиду подтверждена тем, что полученные линии способны расти при более высоких начальных концентрациях пероксида водорода, по сравнению с контрольной линией без адаптации.

Повышение устойчивости микроорганизмов активного ила к последующему обеззараживанию вследствие перекрестной адаптации может стать одним из неблагоприятных эффектов применения РОВ-технологии. Поэтому мы про-

анализировали возможность возникновения устойчивости к обеззараживанию под действием ультрафиолетового излучения (УФ) с длиной волны 264 нм. Для определения влияния освещения на выживаемость после УФ-облучения суспензию активного ила выдерживали в течение часа либо в темноте, либо в условиях освещения видимым светом. Кроме того, анализировали изменения в жизнеспособности клеток в случае присутствия в суспензии пероксида водорода в концентрации 0,2 г/л при УФ-облучении. Число клеток, выживших после УФ-облучения, определяли стандартным методом предельных разведений [3] и выражали через наиболее вероятное число клеток в 1 мл суспензии (НВЧ).

Среди полученных линий ила значимое повышение устойчивости к воздействию УФ обнаруживалось только для линии, адаптированной к 0,2 г/л H_2O_2 , тогда как для линий, адаптированных к более высоким концентрациям H_2O_2 , существенных отличий в устойчивости по сравнению с неадаптированной линией не было. Облучение видимым светом после воздействия УФ повышало выживаемость в отношении всех полученных линий ила, включая неадаптированную по сравнению с соответствующими показателями выживаемости при инкубировании в темноте после воздействия УФ. При этом наибольшее влияние эффекта облучения видимым светом наблюдалось в отношении линий, адаптированных к внесению 0,2 и 0,4 г/л H_2O_2 . Присутствие в среде 0,2 г/л H_2O_2 во время УФ-облучения как с последующим выдерживанием облученной суспензии в темноте, так и при освещении значительно снижало выживаемость по сравнению с вариантом облучения УФ, но без присутствия H_2O_2 , с последующим выдерживанием в темноте. В этом случае эффект облучения видимым светом не менялся для разных линий ила.

Таким образом, при использовании РОВ-технологии на финишной стадии УФ-обеззараживания сточной воды важно учитывать и степень адаптированности активного ила к окислительному воздействию, и фактор освещения сточной воды видимым светом, и возможность перекрестной адаптации к различным стресс-факторам.

Список использованных источников

1. Способ биологической очистки сточных вод с регулируемым окислительным воздействием: пат. RU 2744230 C1 / А.Е. Кузнецов, А.В. Мелиоранский; опубл. 03.03.2021.
2. Lushchak, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals / V.I. Lushchak // Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2011. – Т. 153, № 2. – С. 175–190.
3. Standard methods for the examination of water and wastewater / ed.: E.W. Rice [et al.]. – Washington, DC : American public health association, 2012. – Т. 10.

Физиолого-биохимические свойства алкалотолерантных нитрилгидролизующих родококков

Сыровацкая Г.А., Максимова Ю.Г.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук» –
филиал Пермского федерального исследовательского центра
Уральского отделения РАН, Пермь, Россия,
электронный адрес: gsyrovackya@gmail.com

Нитрилы – органические соединения с цианогруппой в составе молекулы. Они широко используются в промышленности в качестве растворителей, для производства полимеров и лекарственных препаратов [1]. Используя нитрилы как источник питания, бактерии способны разлагать их до соответствующих карбоновых кислот по нитрилазному либо нитрилгидриказно-амидазному пути. В настоящее время биотехнологический подход применяется при производстве акриламида, акрилата аммония, никотинамида [2–4]. Для биотехнологии актуален поиск высокотолерантных производственных штаммов, катализирующих реакции в щелочной среде, в присутствии солей и растворителей.

Цель работы – изучение влияния pH и различных концентраций хлорида натрия на рост и проявление нитрилгидролизующей активности бактерий, выделенных из щелочной среды антропогенного происхождения.

В действующем шламонакопителе АО «Березниковский содовый завод» из донных отложений с pH 11 и грунта старой карты шламоохранилища с глубины 5 см выделены и идентифицированы штаммы *Rhodococcus qingshengii* 5Э (ИЭГМ 1416) и *Rhodococcus erythropolis* 6Э (ИЭГМ 1417).

Изучены особенности накопления биомассы *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э на среде LB при варьировании pH и NaCl. Показано, что *R. qingshengii* 5Э накапливает максимальную биомассу в среде с 10 г/л NaCl и pH от 6 до 10. Накопление биомассы *R. erythropolis* 6Э не имеет выраженной зависимости от концентрации NaCl в среде в пределах от 0,5 до 10 г/л, подавление роста отмечено при pH 11 и 50 г/л NaCl.

На минеральной среде, содержащей фосфаты и NaCl, сорбит или ацетамид в качестве источника углерода, изучена динамика роста и зависимость проявления нитрилгидролизующей активности от фазы роста у штаммов. У *R. qingshengii* 5Э на минеральной среде с pH 8 стационарная фаза наступает на 15 сутки роста, а максимум активности проявляется в поздней логарифмической фазе, тогда как при pH 10 стационарная фаза наступает уже на 10 сут, а накопление биомассы превышает таковое на среде с pH 8 в 2 раза. Нитрилгидролизующая активность при росте *R. qingshengii* 5Э на среде с pH 10 мак-

симальна в стационарную фазу роста. У *R. erythropolis* 6Э при росте на среде с рН 10 позже, чем при рН 8, наступает стационарная фаза роста, а нитрилгидролизующая активность максимальна в начале логарифмической фазы роста.

Установлено, что выделенные штаммы алкалотолерантны и проявляют нитрилгидролизующую активность при росте на щелочной среде. *R. qingshengii* 5Э, выделенный из содового шлама, накапливал больше биомассы на среде с рН 10, чем с рН 8, при этом максимальная активность проявлялась в стационарной фазе роста. *R. qingshengii* 5Э проявлял наибольшую нитрилгидролизующую активность в реакционной среде с рН 10, содержащей 0,5 г/л NaCl. Таким образом, при дальнейшей селекции штаммы перспективны для трансформации нитрилов в щелочных условиях с целью получения соответствующих амидов или биodeградации токсичных нитрильных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Список использованных источников

1. Semi-batch industrial process of nitriles production: Dynamic simulation and validation / K.D. Brito [et al.] // *Computers & Chemical Engineering*. – 2018. – Vol. 119. – P. 38–45.
2. Дебабов, В.Г. Биокаталитический гидролиз нитрилов / В.Г. Дебабов, А.С. Яненко // *Обзорный журнал по химии*. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 376–394.
3. Nitrilase: a promising biocatalyst in industrial applications for green chemistry / J.D. Shen [et al.] // *Critical reviews in biotechnology*. – 2021. – Vol. 41, № 1. – P. 72–93.
4. Cheng, Z. Recent advances and promises in nitrile hydratase: From mechanism to industrial applications / Z. Cheng, Y. Xia, Z. Zhou // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 352.

Разработка биопрепарата на основе термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов

Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А., Айткельдиева С.А.,
Смирнова И.Э., Баймаханова Г.Б.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан,
электронный адрес: elmira_f@mail.ru

Загрязнение окружающей среды углеводородами природного и антропогенного происхождения является серьезной экологической проблемой. Особенно остро данная проблема стоит перед странами, добывающими, транспортирующими и перерабатывающими нефть [1]. Восстановление загрязненных участков с использованием микробиологического процесса (биоремедиация) доказало свою эффективность и надежность благодаря своим экологическим характеристикам [2]. Микроорганизмы, адаптированные к климатическим условиям своих регионов обитания, способны осуществлять эффективную деструкцию нефти даже в условиях сезонных перепадов температур, низкой влажности грунта и солености почвы [3]. Целью настоящих исследований было создание биопрепарата на основе термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов для восстановления нефтезагрязненных почв в условиях аридного климата.

В результате подбора и изучения нефтеокисляющей активности консорциумов термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов были отобраны консорциумы 1 (*Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84У, *Pusillimonas* sp. 1/8ан) и 2 (*Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84У, *Rhodococcus* sp. 1Д/1), как основа биопрепаратов. Для выявления оптимального соотношения культур, входящих в их состав, определяли нефтеокисляющую активность при культивировании на минеральной среде с 1 % нефтью месторождения Доссор (табл. 1).

Таблица 1. Деструкция нефти консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов при разных соотношениях культур

Консорциум 1 (34:84У:1/8ан)	Степень деструкции нефти, %	Консорциум 2 (34:84У:1Д/1)	Степень деструкции нефти, %
1:1:1	63,7	1:1:1	74,7
2:2:1	74,6	2:2:1	65,8
1:2:1	60,6	1:2:1	65,2
2:1:1	71,1	2:1:1	77,8
1:1:2	62,2	1:1:2	85,0

Результаты исследования показали, что через 14 суток деструкция нефти под воздействием консорциума 1 составила 60,6–74,6 %. Наибольшую активность показали варианты 2 (2:2:1) и 4 (2:1:1) – 74,6 % и 71,1 % соответственно. Варианты 1, 3 и 5 утилизировали нефть примерно на одном уровне – 60,6–63,7 %.

При культивировании консорциума 2 биодеградации подверглось 65,2–85,0 % нефти. Наибольшее количество утилизированной нефти отмечено при соотношении штаммов 1:1:2.

Таким образом, для создания биопрепарата на основе консорциума 1 необходимо брать штаммы 34, 84У, 1/8ан в соотношении 2:2:1, штаммы 34, 84У, 1Д/1, входящие в состав консорциума 2 в соотношении 1:1:2.

Получена пастообразная форма биопрепарата на бентоните с добавлением 7 % сахарозы как защитного компонента. Определена жизнеспособность и активность клеток в процессе хранения в течение 4 мес. Исходный титр препаратов составил 10^9 КОЕ/г. Через 4 мес хранения при 4 °С количество бактериальных клеток осталось на том же уровне.

Таблица 2. Нефтеокисляющая активность препаратов при хранении при 4°С

Биопрепарат	Степень утилизации нефти, %			
	30 °С		50 °С	
	после приготовления	4 мес. хранения	после приготовления	4 мес. хранения
1	71,4	70,5	65,2	64,3
2	75,3	74,7	66,9	66,2

Определена исходная нефтеокисляющая активность препаратов при культивировании на минеральной среде с 2 % нефти при разных температурах (табл. 2). Степень деструкции нефти препарата 1 при температуре 30 °С составила 71,4 %, при 50 °С – 65,2 %. Степень деструкции нефти препаратом 2 при температуре 30 °С составила 75,3 %, при 50 °С – 66,9 %. Через 4 мес хранения существенного снижения нефтеокисляющей активности препаратов не наблюдалось.

Список использованных источников

1. Чернявская, М.И. Сравнительная характеристика углеводородокисляющих бактерий различных климатических зон: автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.02.03 / М.И. Чернявская. – Минск, 2016. – 26 с.
2. Azubuike, C.C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects / C.C. Azubuike, C.B. Chikere, G.C. Okpokwasili // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 32 (11). doi: 10.1007/s11274-016-2137-x
3. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments / R.M.M. Abed [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – Vol. 89. – P. 58–66.

Устойчивость бактерий *Rhodococcus* sp. G13 к неблагоприятным условиям среды

Шавела Ю.В., Глушень Е.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: shavela97@mail.ru

Природные среды, подверженные антропогенным и техногенным загрязнением, могут характеризоваться крайне неблагоприятными условиями обитания для живых организмов (экстремальные значения pH, температуры, уровня засоления, влажности, наличие высоких концентраций тяжелых металлов и токсичных органических соединений). В качестве представителей экстремотолерантных и высоко адаптивных микроорганизмов особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus*, которые обладают высокой экологической пластичностью и способностью к окислению широкого спектра ксенобиотиков, полной минерализации органических токсикантов до простых веществ [1, 2]. Известно, что они сохраняют свою метаболическую активность в условиях загрязнения тяжелыми металлами и металлоидами (100–250 мМ), органическими растворителями (от 20 до 80 об/%), способны выживать в широком диапазоне температур (от 4 до 40 °С и выше), кислотности (pH 2,0–9,0), влажности (от 15 до 50 %), а также высокого уровня засоления (2–6 %) [2, 3].

Проведенные ранее исследования показали, что бактерии *Rhodococcus* sp. G13 обладают высоким деструктивным потенциалом в отношении ряда углеводов и многокомпонентных растворителей, характеризуются высокой адгезивной, эмульгирующей и сурфактантообразующей активностью, что способствует повышению биодоступности гидрофобных субстратов для бактериальных клеток [4, 5].

Цель исследования – оценка жизнеспособности клеток бактерий *Rhodococcus* sp. G13 в условиях воздействия стрессовых факторов среды.

В работе было исследовано влияние условий стресса (температура культивирования, криоконсервация, высушивание, изменение pH, засоление) на выживаемость бактерий *Rhodococcus* sp. G13.

Методом культивирования с использованием персонального биореактора RTS-1С было показано, что культура сохраняет метаболическую активность в диапазоне температур 10–40 °С. Было выявлено, что 30 °С является наиболее оптимальной температурой, при которой активный рост клеток начинается уже в первые часы культивирования.

Изучено влияние критически низких температур на жизнеспособность бактерий *Rhodococcus* sp. G13 путем оценки выживаемости клеток после их хранения в течение 30 суток в условиях замораживания при –20 и –80 °С. Было

выяўлена, што выжываемасць клетак пасля хранення пры $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ складае парадка $96,93 \pm 0,14\%$, а дабаўленне гліцэрына ў якасці крיוпротэктара спосабуе павышэнню даннага паказатэля да $97,90 \pm 0,1\%$. Пры тэмпературы хранення $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ паказатэль выжываемасці культуры складае $97,54 \pm 0,11\%$ і $97,88 \pm 0,12\%$ адпаведна.

Ісследована ксеро- і термоустойчивость *Rhodococcus* sp. G13 путем анализа жизнеспособности клеток в условиях высушивания без добавления протектора в температурном интервале $35\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Максимальный уровень выживаемости культуры наблюдался при высушивании в режиме $50 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, где потеря жизнеспособности культуры не превышала $3,34 \pm 0,33\%$. При $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ процент выживаемости клеток составляет не менее $60,5 \pm 1,06\%$, что говорит о высокой степени устойчивости исследуемого штамма к высоким температурам в условиях критически низкой влажности. Полученные данные говорят о высокой устойчивости клеток *Rhodococcus* sp. G13 к резким изменениям температурных условий среды.

Методом измерения оптической плотности культуры была оценена выживаемость клеток в процессе их культивирования в полноценной среде с содержанием NaCl в диапазоне $5\text{--}40\text{ г/л}$ и pH $2,0\text{--}13,0$. Бактерии *Rhodococcus* sp. G13 сохраняли способность к активному росту в среде с диапазоном концентрации NaCl, равным $5\text{--}30\text{ г/л}$, и pH $5,0\text{--}12,0$, что свидетельствует о достаточно высокой солеустойчивости и адаптивности бактерий к условиям защелачивания среды.

Таким образом, была показана высокая адаптационная способность бактерий *Rhodococcus* sp. G13 к стрессовым условиям среды, что обеспечит им конкурентоспособность в природных биотопах и повышение деструктивного потенциала в процессах биоремедиации.

Список использованных источников

1. Stress response in *Rhodococcus* strains / M. Pátek [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Т. 53. – Р. 1–22.
2. Responses to Ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *Rhodococcus* species / I.B. Ivshina [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – Т. 10, № 8. – С. 974.
3. Kuyukina, M.S. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // *Biology of Rhodococcus*. – Springer, Cham, 2019. – С. 231–270.
4. Шавела, Ю.В. Определение спектра утилизируемых субстратов штаммом *R. wratislaviensis* Г13 / Ю.В. Шавела, Е.М. Глушень // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XII Междунар. науч. конф., Минск, 7–11 июня 2021 г. – Минск, 2021. – С. 256–257.
5. Шавела, Ю.В. Адгезивные свойства и сурфактантообразующая способность штамма *Rhodococcus* sp. Г13 / Ю.В. Шавела, К.А. Губчик, Е.М. Глушень // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси. – Минск : Беларус. навука, 2022. – Т. 14. – С. 447–456.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абай Г. 186
Абай Г.К. 146
Абашина Т.Н. 340
Абашева М.А. 412
Абдул Б. 93
Абдильмянова Л.И. 148
Абитаева Г.К. 390
Абрамов А.А. 43
Абрамова Т.Н. 27
Авсиевич Е.И. 244
Айткельдиева С.А. 456
Акатова Е.В. 412
Алексаночкин Д.И. 342, 374
Алексеева А.Н. 170
Алещенкова З.М. 226, 278, 440
Алимова Б.Х. 203, 344, 385
Аллахвердян В.В. 246
Аллацкая Ю.И. 418
Амвросьева Т.В. 192
Амирсаидова Д.А. 346
Ананьева И.Н. 278, 440
Андронов Е.Е. 28
Анохина Т.О. 130
Антонова Н.П. 348
Арашкова А.А. 29, 75
Арзуманова А.Р. 384
Армянинова Д.К. 176
Артемьева О.А. 442
Асатурова А.М. 246, 254
Афошин А.С. 73, 150, 194
Ахматова Н.К. 376
Ахмедов О.Р. 396
Ахметов Л.И. 130

Б

Бабичева Т.С. 444
Бажин А.С. 280
Баймаханова Г.Б. 316, 318, 456
Балюк Н.В. 274
Банникова О. 418
Баранов О.Ю. 268
Барашина В.Р. 172
Барботин В.Р. 350

Барейко А. А. 95
Барейко А.А. 287, 290
Бекмуродова Г.А. 346
Беловежец Л.А. 414
Белодед А.В. 154, 172, 207
Белоусова Е.Б. 152
Бельская И.В. 192
Берестецкий А.О. 304
Берестецкий А.О. 170, 174
Бержанова Р.Ж. 146, 186
Беспярых Д.А. 61
Биричевская Л.Л. 352, 365
Бирюков М.В. 218
Бирюков Р.Н. 416, 420
Бисенова Г.Н. 390
Благодатских С.А. 43
Богатырева М.Д. 154
Богун А.Г. 43, 432
Бондарева К.С. 31
Боркунов Г.В. 156, 158
Ботяновская Ю.И. 268
Бровко Ф.А. 442
Будаева В.В. 401
Бузиков Р.М. 33
Буко А.И. 160
Булавко Г.И. 268
Булатовский А.Б. 365
Булатовский А.Б. 355
Бунеева Е.А. 384
Буриева М.Р. 148

В

Вайнштейн М.Б. 340
Вакар Л.Л. 452
Валентович Л.Н. 85, 87, 97, 110, 114, 118, 180, 215, 230
Ванькевич Н.А. 394
Ванюкова Л.А. 170
Василевская Е.Д. 368
Васина Д.В. 348
Великорецкая И.А. 398
Вердиев Б.И. 348
Веремеенко Е.Г. 31, 69
Веселовский В.А. 61

Веялкина Н.Н. 355
Винтер М.А. 357, 365
Волков А.Г. 359
Волова Т.Г. 182
Волынчук Н.Н. 248
Воробьев А.Н. 43
Вохидов Х.Т. 344
Вустин М.М. 234
Вычик П.В. 91, 162

Г

Галемина И.Е. 194
Галич Д.Е. 418
Гапонова И. И. 164
Гапонова И.И. 238, 250, 409
Герасимович А.Д. 110, 166
Герасимович К.М. 274
Гецевич Е.О. 213
Гигиняк Ю.Г. 39, 97
Гилевская К.С. 396
Гирилович Н.И. 252
Гладченко М.А. 137
Глушень Е.М. 407, 416, 420, 438, 458
Глушков С.М. 294, 300
Гниненко Ю.И. 418
Годовалов А.П. 35, 376
Головнева Н.А. 83, 106, 160, 392, 409
Голубева Д.А. 363
Гончарова И.А. 125
Горбачева М.А. 348
Горелик К.М. 37
Городничев Р.Б. 61
Грибанова Е.А. 39
Губчик К.А. 420
Гуляева Д.Е. 236
Гулямова Т.Г. 148
Гусенков Е.А. 304
Гущин В.А. 348
Гырнец Е.Ю. 254

Д

Дайнеко А.В. 168
Дайнеко Н.М. 256
Далинова А.А. 170, 174
Двойнишников С.В. 272
Дегтярев И.А. 361
Дегтярик С.М. 71
Делеган Я.А. 130, 432
Демин Д.В. 432
Денисенко В.В. 41, 112, 160, 298, 392

Денисенко Ю.А.1 270
Джавахия В.Г. 260
Джавахия В.Г. 276
Дигрис А.В. 162
Долбунова А.Н. 172
Доценко А.С. 270
Дубасова Ю.А. 258
Дубицкий К.А. 43
Дубовик В.Р. 170, 174
Дувалов Е.И. 162
Дудик П.С. 176
Дудун А.А. 178
Дьяконова А.Т. 137
Дюбо Ю.В. 91
Дятлов И.А. 43

Е

Евдокимова О.В. 85, 180
Евдокимова С.А. 172
Евтушенков А.Н. 100
Егорова Д.О. 63
Егорова С.В. 79
Егорова Т.В. 313
Егоров И.А. 313
Елисеева А.Д. 46, 292
Епишкина Ю.М. 200
Ерохин Д.В. 260
Ерхова Л.В. 407
Еськова А.И. 48, 446

Ж

Жданова А.Э. 363
Жебрак И.С. 422, 424
Жила Н.О. 182
Жуковская Л.А. 184, 222, 224
Жунисжан А.Ж. 186
Журавлева Е.А. 262
Жураева Р.Н. 189, 264, 430

З

Зайнитдинова Л.И. 189, 264, 430
Закалюкина Ю.В. 218
Захарченко Н.С. 130, 314
Заяц В.С. 266
Звонарев А.Н. 130
Зеленов Д.В. 150
Зелинский А.А. 108
Зимич С.П. 268
Зиновьева Н.А. 442
Зинченко А.И. 168, 191, 192, 232, 352, 355, 357, 365

Зиятдинов М.Х. 196
Зоров И.Н. 270, 313, 398
Зыль Н.С. 266

И

Иванова Е. В. 51
Иванова Л.А. 350, 361
Иванов О.А. 368
Игнатенко Е.И. 91
Иминова Л.Р. 426
Исмаатов Н.Б. 203
Ишемгулов А.Т. 370

К

Кабардин И.К. 272
Кабашникова Л.Ф. 248
Казаков Р. В. 191
Казаков Р.В. 192
Казанцева О.А. 33, 53, 57
Казловский И.С. 191, 192, 232, 357, 365
Калацкая Ж.Н. 274
Калёнов С.В. 434
Капустина Ю.М. 372
Каракозова М.В. 93
Карташов М.И., 276
Картыжова Л.Е. 278, 428
Касторнов А.А. 280
Квасюк Е.И. 352
Кирюхин М.Ю. 196
Кислицин В.Ю. 55
Клишевич Н.Г. 278, 428
Коваленко С.А. 127
Ковальская Д.С. 394
Ковальская Е.М. 422
Козлов А.И. 43
Козлова О.В. 282
Козлов Н.А. 43
Колодина Е.Н. 442
Коломиец Э.И. 65, 252, 302, 307, 328, 394
Колоскова О.В. 222
Колубако А.В. 91, 322
Колубако А.Н. 330
Константинов А.В. 127, 282
Концевая И.И. 256
Копосова О.Н. 57
Корженков А.А. 59
Корзун Е.В. 97
Корниенко М.А. 61
Королев Н.А. 63
Короткова О.Г. 270, 313

Косимов Д.И. 189, 430
Костылева Е.В. 398
Костюков А.А. 268
Котова И.Б. 137
Кочаровская Ю.Н. 432
Кошак Ж.В. 302
Кошелева У.В. 43
Красковский А.Н. 396
Крестина Е.А. 342, 374
Крицкая Л.А. 121
Кудабаев А. 186
Кудрякова И.В. 73, 150, 194
Кузнецова А.А. 196
Кузнецов А.Е. 452
Кузьмицкая А.А. 434
Кукреш Г.В. 322
Кулешова Ю.М. 198
Куликовская В.И. 396
Куликовская В.И. 213
Кулиш С.А. 121
Кулябин В.А. 57
Купцов В.Н. 65

Л

Лавренова В.Н. 67
Лагоненко А.Л. 100, 135
Ладутько Е.И. 213
Лазутин Н.А. 189, 264, 430
Лайкова А.А. 262, 285
Ламан Н.А. 274
Лебединская О.В. 376
Левданская А.И. 69
Левченко Д.Д. 65
Левчук О.Д. 378
Леонович С. И. 95
Леонович С.И. 71, 236
Леонтьевская Е.А. 73, 150, 194
Леонтьевская Н.В. 73, 150, 194
Лепехина О.В. 384
Летвинова В.С. 29, 287, 290, 309
Летута С.Н. 370
Лещевич А.В. 424
Лещенко Е.В. 158
Лещенко Е.В. 156
Липкин А.В. 102
Литти Ю.В. 262, 285, 326
Лобанов П.Д. 272
Лобанок А.Г. 296
Лойко И.М. 244, 332
Лосев О.А. 309

Лукьянов Д.А. 218
Льонг Тхи Мо 448

М

Мавжудова А.М. 264, 430
Макаревич О.В. 164, 238, 250, 409
Максимова А.М. 75
Максимова Н.П. 31
Максимов А.Ю. 258, 292
Максимова Ю.Г. 46, 77, 292, 436, 454
Максимьюк Е.В. 71
Маматраимова Ш.М. 385
Мандрик-Литвинкович М.Н. 65, 252, 328
Манухина О.А. 200
Маркова Ю.А. 414
Мартынова Е.А. 387
Маскаленко О.А. 294
Махсумханов А.А. 203, 344, 385
Машенцева Н.Г. 205, 234
Мезин М.Г. 43
Меледин В.Г. 272
Мельников О.И. 79, 81
Мижева А.А. 205
Микитюк О.Д. 320, 334
Мирзалиева Н.А. 207
Мороз И.В. 296
Морозова А.Н. 83
Мочалова Е.М. 436
Мукашева Т.Д. 186
Муратова А.А. 85, 87, 114, 180
Мусабаева Б.К. 390
Мустахимов И.И. 209
Мямин В.Е. 37, 39, 97

Н

Назарова Т.А. 320, 334
Назаров П.А. 93
Найденко И.А. 41, 112, 298, 392
Найманов Е.Н. 390
Налетов И.В. 266
Наркевич Д.А. 438
Нарушко М.В. 280
Насметова С.М. 148
Наумович Н.И. 440
Нековаль С.Н. 300
Нестеренко Л.Е. 211
Нечаева И.А. 89, 448
Никандрова А.А. 218
Никанова Д.А. 442
Николайчик Е.А. 91, 135, 162, 322, 330

Николайчук В.В. 213
Никулина О.К. 222
Новикова А.С. 302
Носков А.Е. 340
Носков С.А. 93

О

Оразалы А. 186
Орловская П. И. 95
Осмоловский А.А. 67, 324
Острикова К.В. 198
Острикова М.Я. 127, 282
Охремчук А.Э. 87, 97, 110, 180, 215
Охремчук Е.В. 39, 97, 118, 215, 230

П

Павлова Е.В. 380
Павлова Н.А. 304
Павлюк А.Н. 296
Павлюченко И.В. 382
Пантелеев С.В. 282
Панфилов В.И. 200
Парфенова А.С. 89
Пашкевич Л.В. 248
Песоцкая К.Ю. 100
Петров С.А. 280
Петрухин Д.Д. 43
Петрякова А.Д. 218
Пилигримова Э.Г. 63
Пилипчук Т.А. 307
Плеханова Н.С. 102
Позднякова Н.Н. 444
Позднякова-Филатова И. Ю. 51
Позднякова-Филатова И.Ю. 27, 104
Позднякова-Филатова Т.Ю. 130
Поклонская Н.В. 192
Поливцева В.Н. 426
Пономарева О.Н. 448
Пономарева А.Л. 48, 446
Поплетаева С.Б. 260
Попович С.А. 384
Попов Р.С. 211
Потапович М.И. 198
Потехина М.А. 285
Пригодская В.И. 224
Прокулевич В.А. 198
Проскурнина И.А. 302, 309, 394
Пулатова О.М. 203, 344, 385
Пунтус И.Ф. 130, 448
Пьянкова Е.В. 292
Пятакова Т.И. 266

Р

Радюпов В.Э. 170
Раевская Е.А. 287
Рахманова В.Н. 264
Решетников А.С. 209
Рогожин Е.А. 220, 311
Рожкова А.М. 55, 270, 313, 334, 398
Розова О.Н. 79, 81
Романова Л.В. 164, 238, 244, 250, 409
Романова М.В. 154, 172, 207
Романович Ж.В. 290
Ромашко А.К. 296
Ростова Ю.Г. 196
Рубаник Л.В. 372
Рубель А.А. 108
Рубцова Е.А. 398
Руденко П.А. 73, 194
Руденко П.А.1 150
Рузиева Д.М. 148
Рукавцова Е.Б. 314
Рыбинская Е.И. 274
Рябая Н.Е. 106
Рябинина М.В. 108
Рябова А.С. 384
Рябова Н.А. 33, 57

С

Савич В.В. 110, 396
Саданов А.К. 316, 318
Саидова И.М. 385
Самарцев А.А. 106, 409
Самсонова А.С. 428
Самсонова С.А. 196
Самсонов В.В. 196
Сапожникова К.Ю. 182
Сапунова Л.И. 121, 332, 387, 407
Сапунова Л.И.1 296
Сармурзина З.С. 390
Сатрутдинов А.Д. 398
Сафонова М.Е. 41, 112, 160, 298, 392, 409
Сафронова Г.В. 440
Саханчук А.И. 290
Сверчкова Н.В. 287, 290, 302, 394
Светлова А.С. 75
Севницкая Н.Л. 450
Севостьянов С.М. 432
Семашко Т.В. 184, 222, 224
Семенчукова Е.А. 39, 114
Семкин Д.А. 57

Сенько А.Д. 296
Середа А.С. 398
Сивец Н.В. 372
Сидоренко А. В. 95
Сидоренко А.В. 290, 396
Сидоренко А.В. 71, 110, 166, 213, 236
Сидоренко М.Л. 116
Сидорова Т.М. 246
Сизова А.А. 43
Сиколенко М.А. 118
Синельников И.Г. 260, 313, 334
Синицына О.А. 398
Синицын А.П. 270, 313, 398
Скаун В.В. 162
Скиба Е.А. 399, 401
Скорынина А.В. 57
Скудная Т.М. 332
Слайковский С.Н. 121
Слизень В.В. 123
Смирнова И.Э. 316, 318, 456
Соколова Т.В. 125
Соколов С.Л. 442
Соловей В.И. 407
Соломенцев В.И. 43
Соляникова И.П. 380
Сосновская Н.Е. 125
Спанкулова Г.А. 456
Стариков П.П. 43
Стацюк Н.В. 320
Степанова Е.С., 322
Строгова А.А. 368
Субботин А.М. 280
Суворова В.В. 89
Суворов Д.А. 172, 452
Судакова Е.С. 184
Сузина Н.Е. 448
Суркова Д.Е. 67
Суркова Л.К. 123
Съедин Д.Ю. 43
Сыровацкая Г.А. 454

Т

Тактарова Ю.В. 6, 137
Тамкович И.О. 332
Тарлачков С.В. 73
Тарлачков С.В. 150, 194
Татаркина Л.Г. 316, 318, 456
Ташпулатов Ж.Ж. 189
Тиморшина С.Н. 324
Тимофеев С.Ф. 256

Титова А.Д. 198
Тихонова П.С. 434
Толкачева А.А. 384
Третьякова М.С. 414
Тригубович А.М. 29, 125, 394
Турковская О.В. 444

Ф

Файзулина Э.Р. 316, 318, 456
Федоренчик А.А. 226, 440
Федоров А.Н. 170
Федосова А.А. 226
Филиппова А.С. 89
Филонов А.Е. 130, 448
Фоменко И.А. 205, 342, 361, 363, 374, 382

Х

Ханчевский М.А. 352
Хархасова И.А. 127, 282
Хегай Т.Б. 264, 430
Хмель О.О. 228
Хромова Н.Ю. 172, 200
Хюппенен Е.Д. 230

Ц

Цветков В.О. 274
Цуканов Я.В. 418
Цурикова Н.В. 398

Ч

Чайка Н.Я. 130
Черенков Д.А. 384
Черней И.С. 133
Чернякович М.Н. 300
Чещевик В.Т. 133
Чингизова Е.А. 156, 158
Чиндарева М.А. 168, 232
Чирикова М.С. 420
Чоманов У.Ч. 146
Чудакова К.А. 276
Чулкин А.М. 55
Чурикова А.К. 300

Ш

Шавела Ю.В. 458
Шавыркина Н.А. 403, 405
Шагалова В.А. 234
Шадрин А.М. 33, 53, 57
Шакир И.В. 200
Шаненко Е.Ф. 363, 374

Шарангович М.А. 135
Шарангович М.С. 91
Шарифов М.Р. 203
Шашков И.А. 313, 398
Шевцов Н.А. 368
Шелоник М.А. 236
Шемякин И.Г. 43
Шепшелев А.А. 387, 407
Шестакова А.А. 67
Шехурдина С.В. 262, 326
Шешко П.С. 252
Шиповская А.Б. 444
Ширинкина Л.И. 137
Шитенкова Е.В. 102
Шитиков Е.А. 61
Шишло А.В. 368
Шмелева Н.П. 372
Шмыга Е.Ю. 252
Шмыга Е.Ю. 328
Шруб Е.В. 330
Шутов А.А. 130

Щ

Щепеткова А.Г.1 332
Щербаклова Л.А. 320, 334
Щетко В.А. 164, 238, 250, 292, 409

Э

Эммер Д.Я. 260
Эргашев Р.Б. 189, 264, 430

Ю

Юденкова Т.В. 192
Юрченко А.Н. 152, 228, 240
Юрченко Е.А. 152, 211
Юрченко Е.А. 228
Юшко Е.Ю. 309

Я

Яковлева М.Р. 222
Яковлев А.П. 268
Яруллина Л.Г. 274

А

Abashina T.N. 242
Abdul B.Md. 23, 24
Ahangaran M. 142
Akhmedov O.R. 337

B

Babenko V.V. 19
Belalov I.S. 19
Besarab N.V. 17, 19
Besarab S.V. 19
Birichevskaya L. 338

E

Evtushenkov A.N. 17, 19

F

Fedorova E.N. 140
Fengling Shi 144
Fomenko I.A. 142

G

Geraskina N.V. 140
Gharaviri M. 142
Golomidova A.K. 19
Gryaznov S. 338
Gunnur Dikmen Z. 338

H

Hrusha P.A. 17

I

Ivanova K.V. 19

K

Karakozova M.V. 21, 26
Khodakaramyan G. 242
Kivero A.D. 140
Kulikov E.E. 19

L

Letarov A.V. 19

M

Mashentseva N.G. 142
Mender I. 338
Merve Y. 338

N

Nazarov P.A. 21, 23, 26
Noskov A.E. 242
Noskov S. 26

P

Phan Thi Hoai Trinh 228
Polivtseva V.N. 242

R

Raldugina V.N. 21, 26
Romaniuk L.V. 17

S

Shomurotov Sh.A. 337
Solyanikova I.P. 242
Stoynova N.V. 140
Suzina N.E. 242

T

Tovkach F.I. 17
Turaev A.S. 337

W

Wenqiang Fan 144

Z

Zinchenko A. 338
Zlatohurska M.A. 17

Научное издание

**МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

**Материалы
XIII Международной научной конференции
(Минск, 6–9 июня 2023 г.)**

Ответственные за выпуск *Т. А. Горбачевская, Е. А. Талунчик*
Художественный редактор *В. В. Домненко*
Технический редактор *М. В. Савицкая*
Компьютерная верстка *М. Э. Юрени, И. В. Счеснюк*

Подписано в печать 05.05.2023. Формат 70 × 100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 38,03. Уч.-изд. л. 30,0. Тираж 200 экз. Заказ 94.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом
«Беларуская навука». Свидетельства о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013,
№ 2/196 от 05.04.2017. Ул. Ф. Скорины, 40, 220084, г. Минск.