

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

**III ПУЩИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ
«ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ
В МИКРОБИОЛОГИИ, МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ»**

**(в рамках IX Пущинской конференции
«Биохимия, физиология и биосферная роль
микроорганизмов»)**

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

5–7 декабря 2023 г.

Сборник материалов конференции

Москва
ГЕОС
2023

УДК 579.2
ББК 28.4

Под редакцией д.б.н. *Евтушенко Л.И.*

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

III Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. Москва: ООО «ГЕОС», 2023 г. 000 с.

ISBN 978-5-89118-878-5

Сборник тезисов Школы-конференции, проводимой в рамках IX Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», включает расширенные тезисы устных и постерных сообщений ведущих специалистов-микробиологов и начинающих исследователей по материалам работ, выполненных в научных учреждениях и университетах страны.

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

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

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

SBN 978-5-89118-878-5

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН

СОДЕРЖАНИЕ

Сравнительная характеристика регуляторной области генов малых РНК PrtF <i>Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю.</i>	7
Получение и характеристика нокаут-мутантов метилотрофного фитосимбионта <i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20 по генам шаперонинов GroEL <i>Агафонова Н.В., Екимова Г.А., Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.</i>	8
Чувствительность бактерий к новым антибактериальным соединениям при формировании биоплёнок <i>Алимбеков А.А., Кононова Л.И., Волкова Л.В., Волков А.Г., Полюдова Т.В.</i>	10
Микробное разнообразие бактерий-деструкторов почв индустриальной зоны г. Уфы республики Башкортостан, длительное время подвергавшихся воздействию факторов нефтехимических производств <i>Анисимова Л.Г. Жарикова Н.В.</i>	12
Консервативный остаток триптофана как важный элемент каталитически активных форм эндолизинов бактериофагов RB49 и T5 <i>Аракелян А.Г., Микулинская Г.В., Прохоров Д.А., Чернышов С.В.</i>	13
Разнообразие и антагонистические свойства бактериальных эндофитов винограда <i>Арзамазова К.А., Виноградова С.В., Карасёва Э.В., Юрченко Е.Г.</i>	15
Анализ полного генома штамма <i>Pseudomonas</i> sp. S2611, выделенного из хемоземов озера Атаманское Ростовской области <i>Баукова А.С., Кочаровская Ю.Н., Богун А.Г., Делеган Я.А.</i>	16
Аэробные метилотрофные бактерии рода <i>Ancylobacter</i> как фитосимбионты растений <i>Белова А.А., Доронина Н.В.</i>	17
Генетическая модификация биотехнологически перспективного штамма метанотрофа <i>Methylococcus capsulatus</i> MIR – продуцента белка одноклеточных <i>Бут С.Ю., Розова О.Н., Сулейманов Р.З.</i>	19
Физико-химические свойства метионин аминоксидазы бактерии <i>Thermus thermophilus</i> <i>Быков В.В., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Кудряшов Т.А., Вологжанникова А.А., Соколов А.С., Лантева Ю.С.</i>	21
Секвенирование и анализ генома бактерии <i>Christiangramia</i> sp. KMM 6809, выделенной из красной водоросли <i>Ahnfeltia tobuchiensis</i> <i>Быстрицкая Е.П., Недашковская О.И., Отставных Н.Ю., Кухлевский А.Д., Исаева М.П.</i>	22
Иммобилизация клеток <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и <i>Pseudomonas putida</i> и определение их каталазной, оксидазной и нитроредуктазной активности <i>Вадовская Д.С., Третьякова О.М.</i>	23

Анализ генома и ключевые физиолого-биохимические характеристики <i>Delftia tsuruhatensis</i> ULWDIS3 при выращивании на нафталине Вершинина Д.Д., Ветрова А.А., Иванова А.А., Сазонова О.И.	25
Антагонистическая роль ассоциативной микрофлоры на примере индигенного сообщества <i>Parasalmo mikiss</i> Германова М.А., Сидорова Н.А.	26
Получение рекомбинантного лентивируса, содержащего ген NGF для терапии нейродегенеративных заболеваний Голубенко М.А., Салафутдинов И.И., Архипова С.С., Яковлева А.С.	28
Паттерны первичных метаболитов экстремофильных цианобактерий Голушко Н.И., Билова Т.Е., Фролов А.А., Фролова Н.В., Соболева А.В., Орлова А.А., Силинская С.А., Синетова М.А., Лось Д.А.	30
Видовой состав бактериальных изолятов, ассоциированных с зернобобовыми культурами Алтайского края Игнатъева И.М., Кононова Е.П.	31
Выделение и характеристика бактериальных штаммов с выраженным биотехнологическим потенциалом Иминова Л.Р., Делеган Я.А., Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.	32
Методы математического и компьютерного моделирования в исследовании метаболизма L-аминокислот бактерии <i>C. Glutamicum</i> Казанцев Ф.В., Трофимова М.Ф., Клименко А.И., Лашин С.А.	34
Новый способ получения каспазы-3 Калинин Д.С., Рабушко Е.Н., Майоров С.Г., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.	35
Аэробные метиловобактерии из Соль-Илецких озер Капаруллина Е.Н., Шустова М.Н., Агафонова Н.В., Доронина Н.В.	36
Выделение и характеристика двух новых пептидных антибактериальных соединений из культуральных жидкостей штаммов <i>Streptomyces sp.</i> 44182 и 37078 Каракчиева А.О., Волюнкина И.А., Никандрова А.А.	38
Сравнение геномов бактериофагов рода <i>Tequatrovirus</i> методом генетического штрихкодирования Кирьянова О.Ю., Чемерис А.В., Губайдуллин И.М., Киселев С.С., Панюков В.В., Никулин Н.А., Зимин А.А.	39
Разнообразие бактериального комплекса почв и сопряженных субстратов заповедников Вьетнама Князева А.В.	41
Установление генетического потенциала штамма <i>Dietzia sp.</i> S5, выделенного из образца антропогенно-загрязненного снега Копылова О.А., Французова Е.Э., Богун А.Г., Делеган Я.А.	42
Элиминация донорной культуры <i>Escherichia coli</i> S17-1 после конъюгативного переноса плазмидной ДНК в <i>Rhodobacter capsulatus</i> B10 Майорова Е.В., Петушкова Е.П., Цыганков А.А.	43
Штаммы базидиальных грибов – продуценты монокосвертывающей активности Майорова И.В., Сайнчук А.Д., Псурцева Н.В.	45
Актуальные концепции работы коллекции культур микроводорослей Мальцев Е.И., Куликовский М.С., Кезля Е.М., Мальцева С.Ю.	47
Молекулярный профиль фосфатидилхолинов ксилотрофных базидиомицетов в условиях межвидового антагонизма Манжиева Б.С., Сенник С.В., Мишарев А.Д., Серебряков Е.Б., Котлова Е.Р.	48

Антагонистическая активность стрептомицетов из ризосферы лекарственных растений <i>Мокрушина С.Э., Широких И.Г.</i>	50
Большой С-концевой фрагмент (Met225- Pe412) гемолизина II <i>Bacillus cereus</i> обеспечивает агглютинацию эритроцитов <i>Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Лучкина П.Н., Сиунов А.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Руденко Н.В., Солонин А.С.</i>	52
Новые виды актинобактерий рода <i>Rathayibacter</i> , ассоциированные с травянистыми и древесными растениями <i>Оспенников Ю.В., Демидов А.В., Дорофеева Л.В., Стародумова И.П., Тарлачков С.В., Присяжная Н.В., Субботин С.А., Евтушенко Л.И.</i>	53
Секвенирование и анализ генома бактерии <i>Zobellia</i> sp. KMM 6075, выделенной из тихоокеанской зелёной водоросли <i>Ulva fenestrata</i> <i>Отставных Н.Ю., Быстрицкая Е.П., Исаева К.В., Недашковская О.И., Исаева М.П.</i>	54
LTTR-зависимый промотор <i>sgp</i> -оперона функционирует в отсутствии транскрипционного активатора и эффектора <i>Позднякова-Филатова И.Ю., Иванова Е.В., Фролова А.А., Захарова М.В.</i>	56
Новый штамм <i>Streptomyces</i> sp. Lzd4kr: морфология, физиолого-биохимические свойства и антимикробная активность <i>Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Носков А.Е., Делеган Я.А., Антипова Т.В., Соляникова И.П., Сузина Н.Е.</i>	57
Микробное разнообразие водных ресурсов г. Москвы <i>Полякова А.Н., Бурмистров Е.М., Сидорова Т.А., Поляков Н.Б., Соловьев А.И., Жуховицкий В.Г.</i>	59
Цикл Кребса у облигатного метанотрофа <i>Methylotuvimicrobium alcaliphilum</i> 20Z: загадки и факты <i>Розова О.Н., Мельников О.И., Чистякова (Егорова) С.В., Хмеленина В.Н., Мустахимов И.И.</i>	62
Получение рекомбинантной TAP38 фосфатазы <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Рыжих Ю.С., Позднякова-Филатова И.Ю., Ветошкина Д.В.</i>	63
Выявление скрытых сообществ солоноватоводных амёбоидных протистов в пресноводных биотопах Ладожского озера <i>Рябушева У.Д., Кудрявцев А.А.</i>	65
Проявление антагонизма у дрожжей, выделенных из сельскохозяйственных культур, по отношению к фитопатогенным грибам <i>Савченко В.Е., Качалкин А.В.</i>	66
Культивируемые микроскопические грибы в аэротенках водоочистного сооружения <i>Сайнчук А.Д., Александрова А.В., Щеголькова Н.М.</i>	68
Происхождение и распространение неканонической регуляторной кальцийсвязывающей петли литических пептидаз подсемейства M15_C <i>Тарлачков С.В., Микулинская Г.В.</i>	70
Факторы внешней среды, влияющие на процессы биоповреждения материалов грибами <i>Токарев В.А., Третьякова О.М.</i>	71
Применение интегративной таксономии для решения проблем видовой идентификации инфузорий рода <i>Euplotes</i> (Ciliophora, Euplotidae) <i>Трибун М.М.</i>	73
Сравнение физико-химических и биохимических свойств N-ацетилтрансфераз RimL из разных микроорганизмов <i>Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Быков В.В., Вологжанникова А.А., Шевелева М.П., Кудряшов Т.А., Соколов А.С., Локтюшов Е.В., Лантева Ю.С.</i>	75

Создание штамма <i>Pseudomonas putida</i> BS3701 с мутацией гена, кодирующего регулятор FNR семейства Фролова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю.	76
Потенциал ассоциации бактерий <i>P. yeii</i> и дрожжей <i>S. cerevisiae</i> для экспресс-оценки токсичности водных сред Харькова А.С., Титова А.С.	77
Физико-химические и микробиологические показатели качества кефира Хоботова А.А., Зубко Е.В.	78
Влияние источника углерода на параметры роста и выход растворимого белка у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> К-245 Чепурина А.А.	80
Распространение и фенотипическое проявление гена <i>mprF</i> среди коагулазонегативных стафилококков Ябурова Е.В., Кононова Л.И., Полюдова Т.В.	82

Сравнительная характеристика регуляторной области генов малых РНК *PrrF*

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

ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
tanechka2576@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38746

Ключевые слова: дефицит железа, малые РНК, *prfF*, белок Fur, экспрессия генов

Железо является важным металлом для многих микроорганизмов. Его ионы входят в состав разных белков, в том числе ферментов-диоксигеназ, участвующих в катаболизме углеводов нефти. В бактериях *Pseudomonas putida* BS3701 есть железосодержащие белки нафталин-1,2-диоксигеназа, катехол-2,3-диоксигеназа и катехол-1,2-диоксигеназа, участвующие в катаболизме нафталина. В 2020 году в нашей лаборатории было показано, что в условиях дефицита железа количество мРНК этих диоксигеназ снижается.

В клетках бактерий есть системы, которые контролируют экспрессию генов в условиях дефицита железа: глобальный транскрипционный регулятор Fur и Fur-зависимые малые РНК *PrrF*. При недостатке железа репрессия белка Fur с подконтрольных генов снимается. В этих условиях активируется транскрипция генов *prfF*, что ведет к снижению мРНК целевых генов. Мы предполагаем, что экспрессия генов диоксигеназ находится под контролем малых РНК *prfF*.

Бактерии *Pseudomonas putida* BS3701 имеют два гена *prfF*, идентичных на 94%. Другие представители рода псевдомонад (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*, *syringae*) также имеют два гена *prfF*. Идентичность данных генов и внутри рода, и внутри штамма-более 80%. Мы предполагаем, что наличие двух генов с высокой степенью сходства позволяет гибче приспосабливаться к разным концентрациям железа в клетке за счет разницы в регуляции экспрессии генов малых РНК. Поэтому целью данной работы было охарактеризовать экспрессию генов *prfF* бактерии *Pseudomonas putida* BS3701 в *in vitro* условиях.

Экспрессия Fur-зависимых генов определяется аффинностью комплексов регуляторный белок-оператор и РНКП-промотор.

Для характеристики комплекса белок Fur-регуляторная область *prfF* была установлена консенсусная последовательность Fur-box АТТГАНААТНАТТНТСААТ. С помощью алгоритма выравнивания ClustalW были предсказаны Fur-box генов *prfF P. putida* BS3701. Fur-box *prfF4* имеет последовательность АТГАТААСГАТТАТТАТТГ, а Fur-box *prfF8*- АТСАТААСААТТСТСАТТТ. Для проведения эксперимента по образованию комплекса «регуляторный белок-оператор» фрагмент ДНК, содержащие Fur-box, был амплифицирован с использованием праймеров, имеющих карбоксифлуоресцеин на 5'-конце. Был очищен рекомбинантный белок Fur с последовательностью из 6 гистидинов на N-конце. Для связывания использовали одинаковую концентрацию ДНК и разные концентрации репрессора Fur. По результатам эксперимента нужно отметить, что характер связывания белка Fur с регуляторными областями *prfF4* и *prfF8* отличается. Константа диссоциации комплекса «Fur-регуляторная область *prfF4*» составила 500 нМ. При этой концентрации белка для регуляторной области *prfF8* не достигается половина связывания ДНК.

Для оценки разницы в экспрессии генов *prfF* был проведен эксперимент по транскрипции *in vitro* с радиоактивно-меченными УТР. Область промоторов *prfF* была предсказана с помощью онлайн-сервиса Softberry.

Последовательности -10 и -35 областей для *prfF4* TTGACT и TATTAT, для *prfF8* TTGACG и TATGAT, соответственно. Расстояние между 10 и -35 областями 17 нуклеотидов для обоих генов. Fur-box и -10 область промотора перекрываются. Для проведения эксперимента была очищена РНК-полимераза *Pseudomonas putida* KT2440. Фрагмент ДНК с регуляторной областью, был амплифицирован с использованием специфичных праймеров. Транскрипцию проводили в присутствии разной концентрации репрессора Fur. По результатам эксперимента можно сказать, что сила промотор двух малых РНК одинакова. Однако, для ингибирования транскрипции гена *prfF4* нужна меньшая концентрация Fur.

Получение и характеристика нокаут-мутантов метилотрофного фитосимбионта *Methylobacterium oryzae* CBMB20 по генам шаперонинов GroEL

Агафонова Н.В., Екимова Г.А., Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
nadyagafonova@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38747

Ключевые слова: шаперонин GroEL, нокаут-мутанты, фитосимбиоз.

Белки теплового шока GroEL и GroES представляют собой одну из наиболее важных групп молекулярных шаперонов, необходимых для правильного сворачивания и рефолдинга многих клеточных белков в условиях стресса (Mizobata, Kawata 2018). При этом известно, что ряд микроорганизмов (ризобии и другие протеобактерии, цианобактерии, актинобактерии, *Firmicutes*) обладают множественными паралогами генов *groES* и *groEL*, отличающимися друг от друга (Kumar et al., 2015). Для некоторых клубеньковых ризобий и азотфиксирующих β -протеобактерий было показано, что такие дивергентные гены регулируются различными механизмами и кодируют белки со специализированными функциями. В частности, отдельные шаперонины GroEL/GroES оказались важны не только для стресс-ответа, но и для регуляции симбиотических взаимодействий этих микроорганизмов с растениями и нитрогеназной активности (Kumar et al., 2015).

Ранее мы обнаружили, что известный метилотрофный фитосимбионт порядка *Rhizobiales* – *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T, также обладает двумя бицистронными оперонами генов *groES* и *groEL* (MOC_0690-0691 и MOC_4714-4715), активность экспрессии которых различается десятикратно. Целью настоящего исследования было изучение ролей отдельных шаперонинов GroEL у данного штамма путем получения и характеристики его нокаут-мутантов по соответствующим генам.

Для проверки функциональной избыточности кодируемых белков, мы попытались создать штаммы, лишенные детерминант *groEL1* (MOC_0690) и *groEL2* (MOC_4715) путем замены указанных генов их нефункциональными копиями методом сайт-специфичной гомологичной рекомбинации. Для этого на основе мобилизуемого суицидного вектора pK18mob (Km^R) (Schaefer et al., 1994) нами были сконструированы плазмиды, несущие мутантные варианты генов *groEL* *M. oryzae* CBMB20^T с делецией их внутренних участков (423 и 1296 п.н. внутри рамок *groEL1* и *groEL2*, соответственно) и вставкой гена устойчивости к гентамицину. Полученные конструкции посредством штамма *E. coli* S17-1 переносили в клетки *M. oryzae* CBMB20^T путем двуродительского скрещивания и из полученных трансконъюгантов отбирали только двойные рекомбинанты, устойчивые к гентамицину и чувствительные к канамицину. В результате нами был получен нокаут-мутант *M. oryzae* CBMB20^T по гену *groEL2* (CBMB20 Δ *groEL2*), однако штамм с нарушенным синтезом GroEL1 сконструировать не удалось. Учитывая обнаруженную ранее значительно более активную экспрессию оперона *groESL1*, это свидетельствует о том, что белки GroES1/GroEL1 составляют основной шаперон GroE, необходимый для фундаментальных клеточных процессов и жизнеспособности бактерии-хозяина.

Фенотипический анализ мутанта СВМВ20Δ*groEL2* показал, что рост его на метаноле существенно замедлен (на более чем 12 ч) по сравнению с таковым штамма дикого типа. Кроме того, он оказался заметно более чувствителен к окислительному стрессу, вызываемому присутствием 2% этанола (0,23±0,09% выживших клеток мутанта против 1,41±0,15% исходного штамма), и прогреву при 50 °С в течение 5 мин (22,8±3,14% выживших клеток мутанта против 65,87±7,77% исходного штамма). Поскольку штамм *M. oryzae* СВМВ20^T был выделен из ризосферы и обладает стимулирующими рост растений свойствами (Kwak et al., 2014), мы также оценили влияние инактивации гена *groEL2* на способность данного фитосимбионта к синтезу соединений, влияющих на рост растений. Одной из групп таких веществ являются производные индола – фитогормоны ауксины, активирующие рост, корнеобразование и формирование проводящих тканей растений. Установлено, что продукция индолпроизводных у мутанта по гену *groEL2* снижалась почти в 1,5 раза по сравнению со штаммом дикого типа (до 2,3±0,1 мкг/мл культуральной жидкости у СВМВ20Δ*groEL2* против 3,3±0,2 мкг/мл у исходного штамма, при ОП₆₀₀ культур 1,0). Другой группой биомолекул, важных для взаимодействий с растениями, являются сидерофоры – низкомолекулярные метаболиты-хелаторы, специфически связывающие ионы металлов (Fe, Zn, Ni, Cu, Mn и т.п.), обеспечивают преимущество для выживания и развития микроорганизмов, а также в антагонизме против фитопатогенов. С использованием общепринятого теста на CAS-агаре (Schwyn, Neilands, 1987), в котором результат оценивается по изменению сине-голубой окраски среды на розово-оранжевую, выявлено уменьшение гало вокруг колоний нокаут-мутанта СВМВ20Δ*groEL2* по сравнению с исходным штаммом, что указывает на снижение продукции сидерофоров при разрушении гена *groEL2*.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют, что два имеющихся у *M. oryzae* СВМВ20^T белка GroEL функционально неравноценны. Так, GroEL1 является жизненно-важным шаперонином, необходимым для основных клеточных процессов, тогда как GroEL2 выполняет лишь какие-то специфические дополнительные функции. Тем не менее, нарушение функциональности добавочного шаперонина GroEL2 способно уменьшать не только адаптивность метилотрофного фитосимбионта *M. oryzae* к изменяющимся условиям среды, но и его потенциал в качестве стимулятора роста и развития растений. В дальнейшем мы также планируем провести сравнительный анализ стимулирующего влияния исходного и мутантного штамма на рост и развитие растений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00377, <https://rscf.ru/project/23-24-00377/>.

Литература

1. Mizobata T., Kawata Y. The versatile mutational «repertoire» of *Escherichia coli* GroEL, a multidomain chaperonin nanomachine // *Biophys. Rev.* 2018. V. 10. P. 631–640.
2. Kumar C.M.S., Mande S.C., Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria – novel functions and non-canonical behaviors // *Cell Stress and Chaperones.* 2015. V. 20. P. 555–574.
3. Schaefer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puehler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // *Gene.* 1994. V. 145. P. 69–73.
4. Kwak M.J., Jeong H., Madhaiyan M., Lee Y., Sa T.M., Oh T.K., Kim J.F. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere // *PloS One.* 2014. V. 9(9). P. e106704.
5. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // *Anal. biochem.* 1987. 160(1). P. 47–56.

Чувствительность бактерий к новым антибактериальным соединениям при формировании биоплёнок

Алимбеков А.А.¹, Кононова Л.И.², Волкова Л.В.¹, Волков А.Г.³, Полюдова Т.В.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

³Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.В. Вагнера
alimbekovartem505@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38748

Ключевые слова: лейкоцитарный пептид, мирамистин, изохинолин, хитозан, синергизм, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*.

Биоплёнки являются основной формой существования бактериальных сообществ, придающей бактериям устойчивость к воздействию различных стрессов, в том числе антибиотиков. Известно, что традиционно используемые антибиотики постепенно теряют свою эффективность по причине снижения чувствительности к ним бактерий. В связи с этим поиск и создание новых антимикробных соединений остаётся высоко актуальным. Вместе с тем, остро стоит вопрос утилизации и переработки отходов различных производств, которые зачастую являются ценным источником биологически активных субстанций, в том числе и с антибактериальными свойствами. Такими соединениями являются, например, катионные полисахариды хитозаны, получаемые из хитина – отхода производства морепродуктов [1], и белки и пептиды из побочных продуктов производства препаратов крови [2]. Биологически активные соединения на основе вторичных продуктов могут служить эффективным средством борьбы с бактериями и их биоплёнками.

Целью работы явилась оценка влияния на формирование биоплёнок бактерий-симбионтов человека и животных, хитозана и лейкоцитарного пептида, а также продукта химического синтеза на основе природного сырья и антисептического средства широкого спектра действия – мирамистина.

Объектами для исследований служили бактерии *Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165, *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ВКМ К-12 и *E. coli* ATCC 25922. В качестве антибактериальных соединений использовались: хитозан ($X_{\text{кв}}$ 100%) молекулярной массой 200 кДа и кватернизацией со степенью замещения 100% (НПО «Биоинженерия», РАН, Россия); лейкоцитарный пептид (ЛП) – антибактериальная пептидная фракция, полученная разделением лейкоцитарного белково-пептидного комплекса [2] на хроматографе Äktapurifier (“GE Healthcare”, Швеция); синтетическое производное изохинолина (СА 335–4) – ((8,9-диметокси-5,5-диметил-2,3,5,6-тетрагидроокса-золо[2,3-а]изохинолин-4-ил-2-ил)метил)ртуть(II)хлорид [3], («ИТХ УрО РАН»); мирамистин (ООО «Инфамед», Россия). Формирование моно- и многовидовой биоплёнок в присутствии указанных соединений изучали планшетным методом [4], с определением минимальных концентраций, ингибирующих рост биоплёнок (МБИК). Совместное действия препаратов СА и ЛП на формирование биоплёнок исследовали методом «шахматной доски» [5]. По результатам трех экспериментов определяли среднее значение индексов фракционных концентраций, ингибирующих рост биоплёнок (ФБИК) и проводили изоболограмный анализ.

Показано, что все исследованные соединения в разной степени подавляли формирование биоплёнок, чувствительность бактерий в них была значительно ниже, чем чувствительность планктонных форм. Значения МБИК в несколько раз превышали значения минимальных ингибиторных концентраций (МИК) для планктонных бактерий (табл.). Также отмечено, что значения МБИК препаратов для смешанной биоплёнки превышали таковые для моновидовых плёнок.

Ранее нами было выявлено синергидное действие соединений ЛП и СА в отношении планктонных форм всех исследуемых бактерий [5]. Сочетания ЛП и СА оказались эффективны и для подавления формирования смешанной биоплёнки исследуемых бактерий. Среднее значение индексов ФБИК составляло $0,63 \pm 0,31$. Частный пример изоболограммы совместного действия указанных соединений представлен на рис. 1. Как СА, так и ЛП самостоятельно в субингибиторных концентрациях не подавляли формирование смешанных

биоплёнок. В то же время, использование их совместно эффективно препятствовало плёнообразованию (рис. 2).

Таблица

МИК препаратов для планктонных культур и МБИК для моно- и многовидовой биоплёнок (мкг/мл)

Культуры	Антибактериальные соединения							
	ЛП		СА		X _{кв}		Мирамистин	
	МИК	МБИК	МИК	МБИК	МИК	МБИК	МИК	МБИК
<i>S. aureus</i>	3,12	15,6	2	5	62,5	156	1,56	>50
<i>S. cohnii</i>	1,56	15,6	2	5	7,8	156	1,56	>50
<i>E. coli</i> К-12	6,24	31,25	16	20	125	156	6,25	>50
<i>E. coli</i> 25922	15,6	62,5	16	20	1000	1250	12,5	>50
Многовидовая	–	62,5	–	20	–	625	–	>50

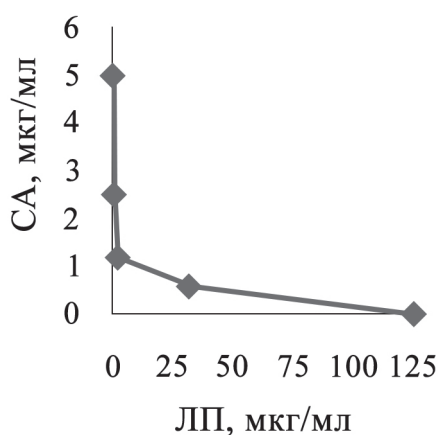


Рис. 1. Изоболограммный анализ совместного действия ЛП и СА на формирование многовидовой био пленки

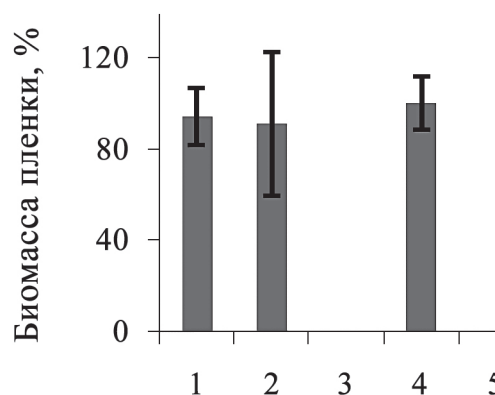


Рис. 2. Биомасса многовидовой био пленки, сформированной в присутствии ЛП и СА в течение 24 ч. 1 – ЛП (0,25 × МБИК); 2 – СА (0,25 × МБИК); 3 – ЛП (0,25 × МБИК) + СА (0,25 × МБИК); 4 – положительный контроль (без соединений); 5 – отрицательный контроль (без бактерий)

Значения индексов ФБИК, находящиеся в диапазоне аддитивности, и вогнутый вид изоболограммы свидетельствуют о выраженном синергидном действии сочетания синтетического препарата СА и ЛП.

Таким образом, отходы пищевой и фармацевтической промышленности могут быть источником ценных биологически активных соединений, в том числе с антимикробной активностью. Подбор сочетаний веществ с синергидным действием позволяет существенно снизить их концентрации и повысить эффективность антибактериальной активности, как в отношении планктонных форм, так и мультивидовых био пленочных сообществ.

Литература

1. Михайлов С.Н., Тихонов В.Е., Варламов В.П. Получение и использование хитина и хитозана. – М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Патент РФ на изобретение № 2737730/2019 г. Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г. Способ фракционирования лейкоцитарных белков.
3. Шкляев Ю.В. Синтез алкалоидов изохинолинового ряда // Бутлеровские сообщения. 2002. № 7. С. 21–34.
4. Stepanović S., Vuković D., Hala V. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci // Apmis. 2007. №8(115). P. 891–899.

5. EUCAST Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents // *Clinical Microbiology and Infection*. 2000. № 9(6). P. 503–508.
6. Алимбеков А.А., Кононова Л.И., Коробов В.П. Поиск новых возможностей для подавления плёнкообразующих бактерий кожных покровов человека // *Химия. Экология. Урбанистика*. Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2022. Т. 2. С. 7–11.

Микробное разнообразие бактерий-деструкторов почв индустриальной зоны г. Уфы Республики Башкортостан, длительное время подвергавшихся воздействию факторов нефтехимических производств

Анисимова Л.Г., Жарикова Н.В.

Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений
с опытно-экспериментальным производством АН РБ
puzzle111@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38749

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, 2,4-Д, малатион, глифосат

Известно, что пестициды – это вещества (или их смесь), химического или реже биологического происхождения, используемые для борьбы с вредителями и сорными растениями, применяющиеся для повышения валового выхода плодовоовощной продукции. В настоящее время применение пестицидов является самым массовым способом защиты растений из-за технологической простоты, эффективности и невысокой стоимости. Однако, их применение также связано с высоким риском загрязнения окружающей среды, нарушением экологического равновесия и серьезного вреда здоровью человека.

Исследовано микробное разнообразие почвенных сообществ индустриальной зоны г. Уфы Республики Башкортостан, длительное время подвергавшихся воздействию факторов химических производств.

Из накопительных культур на минеральной солевой среде, где в качестве единственного источника углерода и энергии содержались действующие агенты пестицидов, были выделены девять изолятов (табл. 1).

Таблица 1

**Описание колоний штаммов бактерий-деструкторов
при росте на плотной богатой среде на 5-й день культивирования**

Обозначение штамма	Колонии					Оптические свойства
	цвет	форма	размер	поверхность	край	
Рр	молочно-белый	круглая	средний (30–40 мм)	ровная	гладкий	блестящая, непрозрачная
Имп-1	белый	неправильная	средний (70–80 мм)	складчатая	ризоидный	матовая, просвечивающая
ДФ-1	белый	неправильная	средний (7–10 мм)	складчатая	лопастной	матовая, непрозрачная
См-1	белый	неправильная	средний (8–10 мм)	шероховатая	зубчатый	матовая, непрозрачная
ДФ-2	бесцветный	круглая	средний (20–30)	ровная	гладкий	блестящая, просвечивающая
№5F	зеленоватый	круглая	средний (20–40)	ровная	гладкий	блестящая, просвечивающая
R-1	коралловый	круглая	средний (20–30)	ровная	гладкий	матовая, непрозрачная
22S	вишневый	круглая	средний (30–40)	ровная	гладкий	блестящая, непрозрачная
Торф-5 роз	розовый	круглая	средний (18–12)	ровная	зубчатый	блестящая, непрозрачная

Затем исследовалась субстратная активность изолятов по отношению к действующие агенты пестицидов, а именно: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4-Д), глифосата и малатиону. Эксперименты проводились на минимальной жидкой солевой среде, разделяющей вышеуказанное соединение в качестве единственного источника углерода и энергии, в трех повторностях.

Таблица 2

Рост бактериальных штаммов на гербицидах как единственных источников углерода и энергии

Обозначение штаммов	Субстрат		
	2,4-Д, 0,5 г/л	глифосат, 0,5г/л	малатион, 0,5 г/л
Рр	+	+	+
Имп-1	–	–	+/-
ДФ-1	+	+/-	+
СМ-1	–	–	+
ДФ-2	+	–	+
№5F	+	+	+
R-1	+	–	+
22S	+	–	+

Условные обозначения: «+» – наличие роста; «–» – отсутствие роста, «+/-» – рост слабый.

Как видно из табл. 2, на малатионе выросли все проверенные изоляты в то время как глифосат в заявленных концентрациях оказался более сложным субстратом для исследуемых биологических культур. На нем в той или иной степени выросли всего три штамма.

Следует отметить, что штаммы Рр и 22S росли на большинстве субстратах, что показывает их полисубстратную активность и свидетельствует об их перспективности для использования в технологиях биоремедиации окружающей среды в дальнейшем.

Консервативный остаток триптофана как важный элемент каталитически активных форм эндолизинов бактериофагов RB49 и T5

Аракелян А.Г.^{1,2}, Микулинская Г.В.¹, Прохоров Д.А.², Чернышов С.В.¹

¹Филиал Института биоорганической химии РАН

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
arkatsachndir@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38750

Ключевые слова: эндолизин, консервативная аминокислота, ЯМР-спектроскопия

Бактериофаги RB49 (Straboviridae) и T5 (Demerecviridae) класса Caudoviricetes – литические фаги, инфицирующие грамотрицательную бактерию *Escherichia coli*. Для гидролиза пептидогликана бактериальной клеточной стенки на стадии выхода зрелого потомства из клетки-хозяина они индуцируют собственные ферменты – эндолизины EndoT5 и EndoRB49. Несмотря на неблизкое родство самих бактериофагов, EndoT5

и EndoRB49 являются ортологами и относятся к общему, весьма многочисленному, подсемейству металлопептидаз M15_C. Оба белка состоят из одного домена, гидролизуют связь L-Ala-D-Glu и связывают каталитический ион цинка. EndoT5, помимо каталитического Zn^{2+} , связывает также ион кальция, являющийся структурным регулятором. Следует отметить, что механизм связывания субстрата пептидазами подсемейства M15_C не изучен.

Биоинформатический анализ последовательностей пептидаз подсемейства M15_C с помощью программ Clustal W и ESPript 3.0 позволил установить наличие в них строго консервативного триптофана вблизи активного центра. У EndoT5 консервативный триптофан находится в кальцийсвязывающей петле, в то время как у EndoRB49 кальциевая регуляция отсутствует. Остаток консервативного триптофана не входит в состав регулярных элементов вторичной структуры EndoT5 и EndoRB49. Его боковая цепь экспонирована в раствор.

Установление роли консервативного остатка триптофана в поддержании структуры и реализации каталитической функции этих эндолизинов проводилось с помощью сайт-направленного мутагенеза. В целях исследования было получено четыре мутанта: EndoT5W114A, EndoT5W114F, EndoRB49W109A и EndoRB49W109F. Фенилаланиновые мутанты эндолизинов характеризуются 30% активностью относительно нативных форм; аланиновый мутант EndoRB49 – остаточной 5% активностью. Аланиновый мутант EndoT5 является неактивным [1].

Связь уровня активности с изменениями в структурной организации была установлена по данным 1H ЯМР спектроскопии нативных и мутантных форм EndoRB49(Zn^{2+}) и EndoT5($Zn^{2+}Ca^{2+}$). Как иллюстрирует рис. 1, по мере сокращения объема остатка W → F → A сигналы остатков гистидинов активного центра (H117 для EndoRB49 и H133 для EndoT5) смещаются в высокопольную область, что коррелирует с уменьшением уровня их ферментативной активности [1].

Помимо этого, характер упаковки гидрофобного ядра обоих эндолизинов также изменяется по мере сокращения объема остатка. Стоит отдельно проанализировать сигнал γH Пе82 в высокопольной части спектра

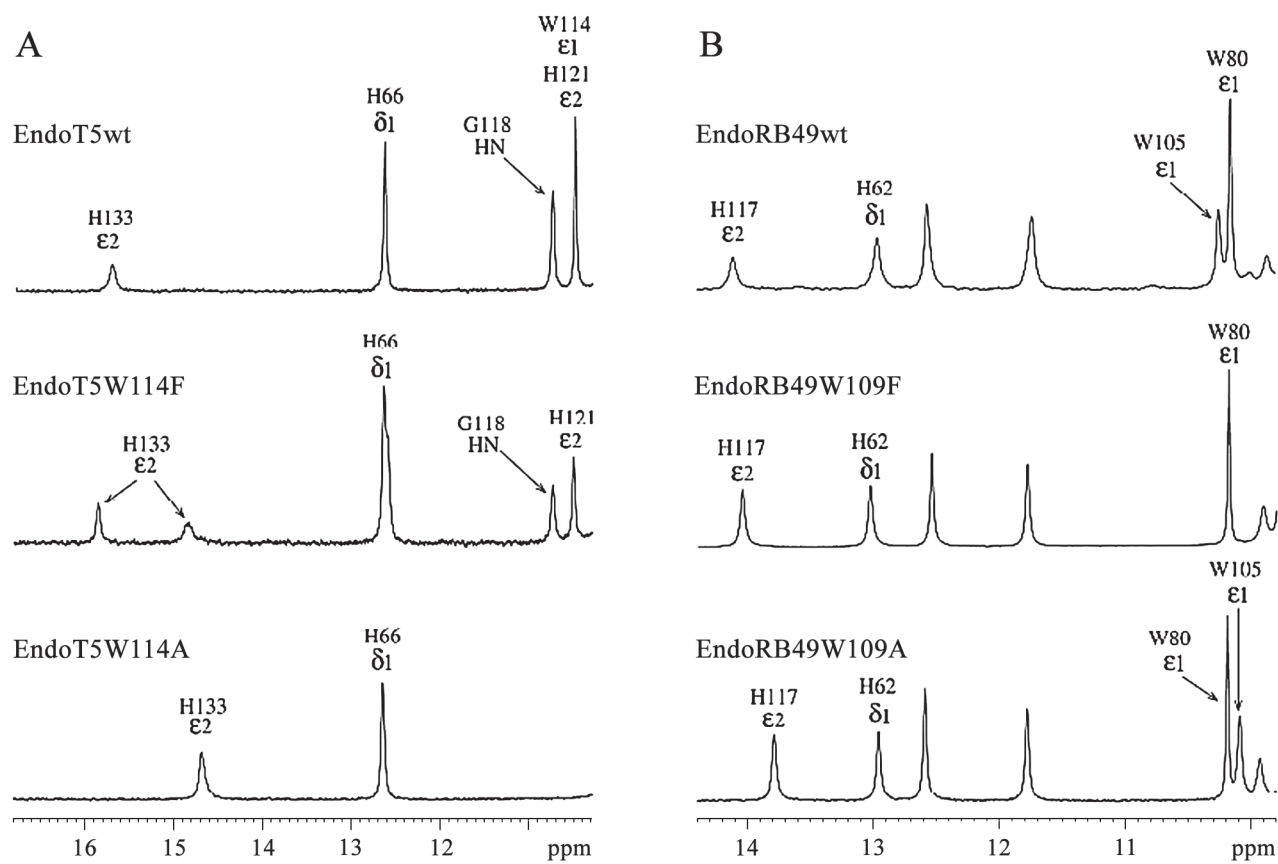


Рис. 1. Низкопольная часть 1H ЯМР спектров нативных и мутантных форм EndoT5($Zn^{2+}Ca^{2+}$) (A) и EndoRB49(Zn^{2+}) (B). Адаптировано из [1]

EndoT5: падение его интенсивности отражает падение средства EndoT5 к регуляторному кальцию по мере сокращения объема остатка. Ранее было установлено, что этот сигнал является маркером фиксации иона кальция кальций-связывающей петлей [2].

Следовательно, триптофан W114/W109 эндолизинов бактериофагов T5 и RB49, имея объемную боковую группу специфического строения, оказывает значительное влияние на уникальность характера упаковки структур ферментов, что делает этот остаток незаменимым посредником в реализации каталитической активности. Строгая консервативность этого остатка во всем обширном, насчитывающем более 700 потенциальных членов, подсемействе пептидаз M15_C позволяет экстраполировать этот вывод на все известные и гипотетические цинксодержащие L-аланоил-D-глутаматпептидазы.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00210.

Литература

1. Mikoulskaia G.V.; Prokhorov D.A.; Chernyshov S.V.; Sitnikova D.S.; Arakelian A.G.; Uversky V.N. Conservative Tryptophan Residue in the Vicinity of an Active Site of the M15 Family L,D-Peptidases: A Key Element in the Catalysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13249. <https://doi.org/10.3390/ijms241713249>.
2. Prokhorov D.A.; Mikoulskaia G.V.; Molochkov N.V.; Uversky V.N.; Kutysenko V.P. High-resolution NMR structure of a Zn²⁺-containing form of the bacteriophage T5 L-alanyl-D-glutamate peptidase. *RSC Adv.* 2015, 5, 41041–41049, <https://doi.org/10.1039/c5ra05993c>.

Разнообразие и антагонистические свойства бактериальных эндофитов винограда

Арзамазова К.А.¹, Виноградова С.В.¹, Карасёва Э.В.², Юрченко Е.Г.¹

¹ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия»,
Краснодар

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»
arzamazova.bio@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38751

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, бактерии, эндофиты, родовой состав, MALDI-TOF, секвенирование по Сэнгеру

Краснодарский край занимает лидирующие позиции в виноградарстве и виноделии Российской Федерации. Общая площадь виноградников на начало 2022 г. в Краснодарском крае составила 28,4 тыс. га (33,0% от всех площадей виноградников в России), из них в плодоносящем возрасте – 21,8 тыс. га [1]. «Спрятанный микробный мир» оказывает прямое влияние на рост, развитие, урожайность, фитоиммунитет и приспособление к меняющимся условиям существования растения-хозяина – винограда [2].

Цель работы – определение видового состава эндофитных бактерий, выделенных из вегетативных органов *Vitis vinifera*.

Лозу и листья винограда сортов Молдова, Мерло, Красностоп золотовский, а также дикорастущих образцов, поверхностно стерилизовали и измельчали. Полученную суспензию высевали на чашки с МПА и R₂A агаром. Далее колонии рассеивали до чистой культуры и анализировали их фенотипические, биохимические и тинкториальные свойства, а также проводили идентификацию с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

В период 2021–2022 гг. был получен 71 изолят эндофитных бактерий. По данным MALDI-TOF-анализа наиболее распространенным был филум *Proteobacteria* (62,5%): были идентифицированы представители родов *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Leclercia* и *Enterobacter*. Менее часто встречались филумы *Firmicutes*

(18,9%) и *Actinobacteria* (18,9%). Из филума *Firmicutes* обнаружен только род *Bacillus*, а среди *Actinobacteria* выделены *Microbacterium* и *Curtobacterium*.

Результаты MALDI-TOF-анализа подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру гена 16s рРНК. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с базой данных Генбанка NCBI с использованием BLASTn. В результате была подтверждена видовая идентификация выделенных изолятов.

Литература

1. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://msh.krasnodar.ru> (дата обращения 13.10.2023)
2. *Hardoim P.R. van Overbeek L.S., van Elsas J.D.* Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*. 2015. V. 16. № 10. 463–471.

Анализ полного генома штамма *Pseudomonas* sp. S2611, выделенного из хемоземов озера Атаманское Ростовской области

Баукова А.С.^{1,2}, Кочаровская Ю.Н.¹, Богун А.Г.¹, Делеган Я.А.¹

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

² ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»
ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ
baukova_26@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38752

Ключевые слова: анализ генома, секвенирование, вторичные метаболиты.

Pseudomonas – это разнообразный род бактерий, занимающий множество ниш и сред обитания. Такое широкое распространение в окружающей среде обуславливает метаболическую универсальность данной таксономической группы. Способность к использованию различных химических соединений в качестве источника углерода, азота, или фосфора вызывает интерес к данным микроорганизмам с точки зрения применения их в биотехнологии. Род *Pseudomonas* также включает в себя ризобактерий, которые обладают свойствами, стимулирующими рост растений, за счет антибиотиков против грибковых, бактериальных и вирусных агентов, выработку синильной кислоты, продуцирование сидерофоров (Lyu et al., 2019).

В ходе данной работы были изучены метаболические возможности и генетическая организация штамма *Pseudomonas* sp. S2611. Штамм выделен методом накопительных культур из хемоземов озера Атаманское Ростовской области.

ДНК штамма S2611 выделена фенол-хлороформным методом, библиотеки подготовлены с помощью набора Raissol SG GM – plus, и секвенирована на платформе GenoLab-M. Первичные прочтения подвергнуты триммингу с помощью Trimmomatic v. 039 и отфильтрованы по качеству не ниже 90%. Для сборки использовали ПО SPAdes v. 3.15.4. Таким образом, геном размера 6 190 645 п.н. был собран до контигов. Количество контигов составило 56, из них характеристике N50 соответствуют контиг равный 315 451 п.н., в то время как максимальный размер контига – 638 417 п.н. Содержание GC в геноме штамма составляет 59,9%. Геном содержит 5589 генов, из них 5516 белок-кодирующих последовательностей, 67 генов тРНК, 5 генов рРНК и 1 ген тмРНК.

Штамм S2611 идентифицирован как представитель рода *Pseudomonas* на основании последовательности гена 16S рРНК. Для установления видовой принадлежности исследуемого штамма использовали метод ДНК-ДНК гибридизации (DDH) с помощью сервиса TYGS. Согласно данным полногеномного секвенирования ближайшим родственным видом штамма S2611 является *Pseudomonas atacamensis* M7D1 (DDH 72,6%).

Также выполнена функциональная аннотация штамма с помощью ПО Prokka, BlastKoala и KEGG. Поиск кластеров, ответственных за продукцию вторичных метаболитов, производился с помощью сервиса antiSMASH. Выявлено 11 регионов биосинтетических генных кластеров, относящихся к типам N-acetylglutaminylglutamine amide (NAGGN), non-ribosomal peptide metallophores (NRP-metallophore), ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product – RiPP (RiPP-like), redox-cofactor, aryl polyenes. Из них арилполиен имеет схожесть 40% с известным кластером, фенгидин – 37%, пиовердин – 21%, ланкацидин С – 13%.

Таким образом, нами собран и проанализирован геном штамма *Pseudomonas* sp. S2611, а также выполнена оценка его метаболического потенциала.

Литература

1. Lyu D., Backer R., Robinson W.G., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria for cannabis production: yield, cannabinoid profile and disease resistance // Front Microbiol., 2019, V. 10.

Аэробные мезофильные бактерии рода *Ancylobacter* как фитосимбионты растений

Белова А.А., Доронина Н.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
chemodurova.alina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38753

Ключевые слова: аэробные мезофильные бактерии, индолы, сидерофоры, стимуляция роста растений, сольюбилизация нерастворимых фосфатов

Аэробные мезофильные бактерии (мезофильы) повсеместно распространены в природе и часто ассоциированы с растениями. Такая связь является взаимовыгодной: растения образуют метанол и другие C_1 -метаболиты, которые мезофильы используют в качестве источника углерода и энергии. Мезофильы, в свою очередь, стимулируют рост и развитие растений за счет продукции фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гибберелинов) и витаминов.

Из ризосферы лапчатки (*Potentilla* sp. L.), ризосферы моркови дикой (*Daucus carota* L.) и филлосферы дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.) нами на среде с метанолом выделены штаммы VT, Dau2 и 6x-1, соответственно.

На основании результатов физиолого-биохимического, филогенетического и филогеномного анализов, а также расчета геномных индексов (dDDH, ANI, AAI, POCP), исследуемые штаммы описаны как новые виды рода *Ancylobacter*: *A. radialis* VT^T (ВКМ В-3255^T), *A. plantiphilus* Dau2 (ВКМ В-3227^T) и *A. crimeensis* 6x-1^T (ВКМ В-3256^T).

Поскольку штаммы VT^T, Dau2 и 6x-1^T были выделены с растений, то представляло интерес выявить основы этой взаимосвязи. При выращивании штаммов на жидкой среде «К» с метанолом (0,5% об./об) и нерастворимым $Ca_3(PO_4)_2$ (5 г/л) концентрация растворенного фосфора в культуральной жидкости составила от 150 до 200 мкг/мл. Обнаружено, что исследуемые штаммы VT^T, 6x-1^T и Dau2 формировали вокруг своих колоний зоны просветления на агаризованной среде, что свидетельствовало о способности исследуемых мезофильов к сольюбилизации $Ca_3(PO_4)_2$ и преобразованию недоступного для бактерий и растений соединения фосфора в растворимую форму (рис.). Мезофильы при росте на метаноле закисляют среду, образуя формиат, растворяющий трикальцийфосфат. Наряду с этим, при анализе геномов штаммов VT^T и 6x-1^T обнаружены гены сольюбилизации фосфатов (экзополифосфатаза, щелочная фосфатаза; пирофосфатаза; неорганическая дифосфатаза) и оперон *phn*, кодирующий С-Р-лиазную систему.

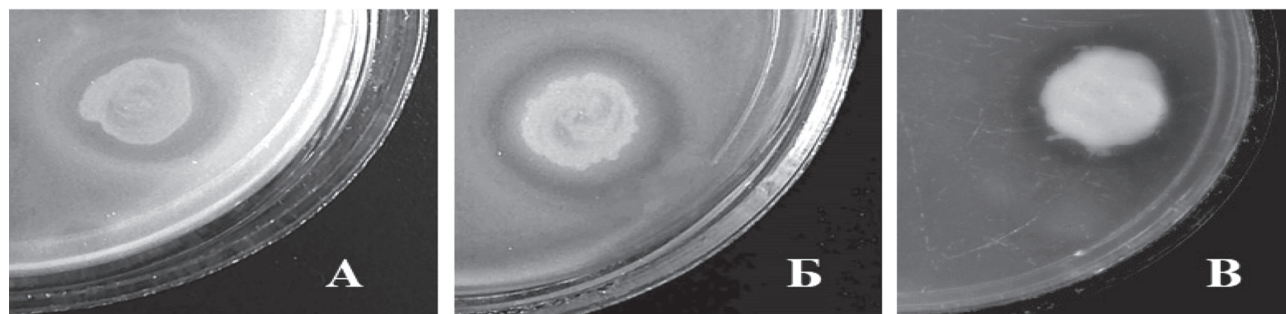


Рис. Солюбилизация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ штаммами VT^T (А), 6х-1^T (Б) и Dau2 (В) на 10-е сутки культивирования на агаризованной среде «К» с добавлением метанола (0,5 % об./об.) и трикальцийфосфата (5 г/л)

Показано, что через 7 суток культивирования на среде с CAS-реактивом вокруг колоний изолятов VT^T, 6х-1^T и Dau2 формировались гало розово-оранжевого цвета, что свидетельствовало о синтезе сидерофоров. Полученные в настоящем эксперименте результаты согласуются с данными, выявленными при анализе геномов новых метилотрофных изолятов. Так, у штаммов VT^T и 6х-1^T был идентифицирован полный кластер генов биосинтеза сидерофора фускахелина (*Fuscahelin biosynthetic gene cluster*). Кроме того, в геномах штамма VT^T и 6х-1^T выявлен кластер генов биосинтеза азобактина.

Предварительная обработка стерильных семян тремя штаммами метилотрофных бактерий статистически значимо повышала скорость роста как надземной, так и подземной части проростков у всех исследованных нами растений, независимо от их принадлежности к той или иной таксономической группе. Причем, различия в динамике развития колонизированных и неcolonизированных (Контроль) проростков отмечались на самых ранних этапах экспериментов. При колонизации двудольных видов культурных растений наилучшие результаты показал штамм *A. crimeensis* 6х-1^T. Так, на 8-е сутки культивирования проростков гороха, колонизированных штаммом 6х-1^T, среднее значение высоты побега превышало на 21,1% ($p = 0,000612$) соответствующее значение в контроле, а длина главного зародышевого корешка – на 19,3% ($p = 0,000968$). Причем, наблюдалось существенное возрастание сырой массы корневой системы – на 27,8% ($p = 0,000000$). Аналогичная тенденция прослеживалась также на модели салата листового (табл.).

Таблица

Влияние штаммов *A. crimeensis* 6х-1^T, *A. radidis* VT^T и *A. plantiphilus* Dau2 на рост и морфогенез культурных растений семейств *Fabaceae* и *Brassicaceae* в условиях *in vitro*

Штамм	Длина (см)		Сырая масса (мг)	
	побега	зародышевого корешка	побега	корневой системы
Сем. <i>Fabaceae</i>				
Горох овощной [<i>Pisum sativum</i> L., сорт Оскар Агро], 8 сут				
6х-1	13,80±0,52***	16,72±0,47***	40,87±0,78***	34,92±0,89***
VT	13,59±0,48***	16,10±0,62*	41,69±0,68***	33,14±1,21***
Dau2	13,50±0,42***	16,01±0,47*	39,92±0,84**	34,55±0,82***
контроль	11,42±0,40	14,04±0,61	37,64±0,70	27,31±0,95
Сем. <i>Brassicaceae</i>				
Салат листовой [<i>Lactuca Sativa</i> , сорт «Московский парниковый»], 8 сут				
6х-1	4,49±0,13***	4,26±0,35**	18,2±0,2***	8,92±0,18***
VT	4,28±0,17**	4,23±0,35**	17,3±0,2***	8,25±0,24***
Dau2	4,41±0,11***	4,27±0,22***	16,3±0,3***	8,69±0,16***
контроль	3,67±0,10	3,16±0,16	13,0±0,4	3,50±0,14

Выявленная в экспериментах *in vitro* активная стимуляция корнеобразования у колонизованных исследуемыми мезофильными растениями согласуется со способностью этих бактерий продуцировать ауксины. Проведенный нами анализ культуральной жидкости штаммов VT^T, бх-1^T и Dau2, показал высокое содержание индолпроизводных: 9, 11 и 8 мкг/мл, соответственно.

Таким образом, установлена способность штаммов *A. plantiphilus* Dau2, *A. radialis* VT^T и *A. crimeensis* бх-1^T синтезировать индолы, сидерофоры, растворять минеральные фосфаты и стимулировать рост гнотобиотических растений, что указывает на перспективность применения этих фитосимбионтов в качестве стимуляторов роста растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051).

Генетическая модификация биотехнологически перспективного штамма метанотрофа *Methylococcus capsulatus* MIR – продуцента белка одноклеточных

Бут С.Ю.¹, Розова О.Н.¹, Сулейманов Р.З.²

¹ ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
but@pbcras.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38754

Ключевые слова: Метанотрофные бактерии, белок одноклеточных, синтез гликогена, гексулозофосфат-синтаза.

Метан является вторым по распространенности парниковым газом на планете после углекислого, однако он обладает на порядок большим потенциалом глобального потепления. В связи с этим в последнее время возрастает интерес научного сообщества к метанотрофным бактериям – особой группе микроорганизмов способных использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. С другой стороны, данный интерес обусловлен также биотехнологическими перспективами использования метанотрофов, которые являются продуцентами целого спектра полезных соединений, таких как белок одноклеточных, биоразлагаемые пластики, биопротекторы, органические кислоты, красители и т.д.

Недавно выделенный термотолерантный метанотроф *Methylococcus capsulatus* MIR (Oshkin et al., 2022) является привлекательным объектом для получения кормового белка ввиду как высокого содержания белковой составляющей клетки (~70% сухой массы), так и высокой оптимальной температуры культивирования (42 °C), что позволяет снизить затраты на охлаждение биореакторных установок. Несмотря на многообещающие характеристики нового штамма, всегда имеют место попытки улучшения существующих параметров с целью повышения выхода целевого продукта и/или улучшения ростовых характеристик продуцента. В геноме *Mc. capsulatus* MIR была обнаружены два гена, кодирующие гликогенсинтазу (*glgA1* и *glgA2*). Это позволяет предположить, что данный метанотроф накапливает гликоген в качестве запасного углевода. Элиминация путей синтеза запасных углеводов может увеличить процентное содержание белка в биомассе метанотрофов (Бут с соавт., 2020). Нами были получены мутанты по генам *glgA1* и *glgA2*. Обнаружено, что инактивация каждого из генов в отдельности практически не влияла на содержание как гликогена, так и белка. При этом, одновременное выключение данных генов приводило практически к полному исчезновению гликогена. Однако, вопреки ожиданиям, эта модификация не привела к повышению содержания белка в биомассе (табл. 1).

Содержание белка и гликогена в биомассе дикого и мутантных штаммов *Methylococcus capsulatus* в зависимости от условий выращивания

Условия	Штамм	Гликоген, мг/г биомассы	Белок, мг/г биомассы
Избыток азота (1 г/л KNO ₃)	WT	14.3±3.8	496±15
	ΔglgA1	9.4±2.5	420±22
	ΔglgA2	17.6±3.2	420±17
	ΔglgA1ΔglgA2	1.1±0.4	477±16
	Δglk	1.3±0.1	498±27
Лимитирование азотом (0.29 г/л KNO ₃)	WT	202±54	297±63
	ΔglgA1ΔglgA2	2.8±0.3	443±8

Это может быть связано с тем, что *Mc. capsulatus* MIR накапливает на порядок меньше гликогена, чем *Methylotheobacterium alcaliphilum* 20Z, у которого элиминация синтеза запасных углеводов приводила к 50%-му повышению содержания белка. Известно, что лимитирование по источнику азота может приводить к повышенному накоплению клеткой гликогена. Штамм *Mc. capsulatus* дикого типа, выращенный в среде с пониженным содержанием KNO₃, действительно накапливал ~ в 13 раз больше гликогена и при этом в его клетках было ~ в 1,6 раза меньше белка. В тоже время у мутанта ΔglgA1ΔglgA2 ожидаемо не было гликогена, но уровень белка практически не отличался от дикого типа. Таким образом, наши результаты говорят о том, использование штамма ΔglgA1ΔglgA2 позволяет сократить затраты на компоненты среды культивирования без снижения продуктивности получения белка одноклеточных из метана.

В геноме *Mc. capsulatus* MIR были обнаружены две копии ключевых генов рибулозомонофосфатного пути ассимиляции углерода метана – гексулозофосфатсинтазы (*hps*) и гексулозофосфатфосфатизомеразы (*hpi*). Ранее в геномах метанотрофных бактерий обнаружены от одной до трех копий данных генов (Розова с соавт., 2017), причем штаммы с тремя копиями характеризовались выдающимися ростовыми характеристиками. С целью изучения влияния копийности кластера *hps-hpi* на ростовые характеристики *Mc. capsulatus* MIR нами были инактивированы с помощью инсерционного мутагенеза отдельные копии *hps*, а также внесена на плазмиде третья копия данного гена. Однако, несмотря на увеличение экспрессии гексулозофосфатсинтазы у штамма с плазмидой и ее уменьшения у мутантов разницы в ростовых характеристиках между полученными модифицированными штаммами и диким типом обнаружено не было. Это указывает на отсутствие прямой корреляции между копийностью генов рибулозомонофосфатного пути и ростовыми характеристиками метанотрофов.

Работа выполнена в рамках проекта «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» # 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ.

Физико-химические свойства метионин аминоксептидазы бактерии *Thermus thermophilus*

Быков В.В.², Трунилина М.В.², Болдаевский И.С.², Кудряшов Т.А.¹,
Вологжанникова А.А.¹, Соколов А.С.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹ Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН –
обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН

² Пушинский филиал РОСБИОТЕХ
naggilan88@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38755

Ключевые слова: метионин аминоксептидаза, МАП, кобальт-связывающие белки, *T. thermophilus*, гуанидин гидрохлорид.

Метионин аминоксептидазы (МАП) – представляет собой металл-зависимую протеазу, которая удаляет N-концевой метионин во время синтеза полипептидной цепи. Эффективность гидролиза ограничивается радиусом боковой цепи второго после метионина аминоксептидного остатка. МАП подразделяются на два класса (тип I и тип II), последний характеризуется вставкой из 60-ти аминоксептидов в каталитический домен. В клетках эукариот обнаружены МАП I и II типа. В бактериях функционирует только МАП I типа, а в археях только МАП II типа.

Ввиду низкой термостабильности и ограниченной субстратной специфичности МАП *E. coli* актуальным является поиск гомологичных ферментов из экстремофильных организмов. В этой связи цель данной работы заключается в изучении свойств МАП бактерии *T. thermophilus* (Tth-МАП). До настоящего времени данные о трехмерной структуре фермента, его специфичности и физико-химических свойствах отсутствовали.

Ген *TTH_RS08450*, кодирующий предполагаемую метионин аминоксептидазу бактерии *T. thermophilus* (ВКМ В-1605), клонирован в вектора рЕТ-29 и рНUE. Белок Tth-МАП наработан в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен до гомогенного состояния.

Современными методами физической химии исследованы свойства Tth-МАП в апо-форме и в Co^{2+} -связанном состоянии. Оценка величины равновесной константы связывания Co^{2+} указывает на слабое сродство Tth-МАП к Co^{2+} , $K = (1-6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Методом динамического светорассеяния установлено, что Tth-МАП является мономером. Методом кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области исследованы вторичные структуры фермента. Tth-МАП характеризуется преобладанием α -спиралей (34,8%), при этом связывание катионов кобальта ферментом не оказывает влияния на содержание элементов вторичной структуры. Методами регистрации собственной флуоресценции и дифференциальной сканирующей калориметрии исследована термостабильность фермента. Tth-МАП устойчив к высоким температурам, середина перехода апо-формы белка составляет 65,6 °С. Связывание кобальта приводит к увеличению термостабильности Tth-МАП до 80 °С. Оценена рН-зависимая стабильность третичной структуры фермента. МАП вне зависимости от присутствия катионов кобальта не проявляет рН-индуцируемых конформационных переходов в диапазоне рН от 3 до 11,5. Проверена устойчивость к действию гуанидин гидрохлорида (GdHCl). Данные полученные методом собственной белковой флуоресценции свидетельствуют о том, апо-форма Tth-МАП обладает устойчивостью к GdHCl с серединой кооперативного перехода при 1,4 М GdHCl. В Co^{2+} -связанной форме фермент не имеет кооперативного перехода, наблюдается постепенное плавное разворачивание с увеличением концентрации GdHCl.

Фермент Tth-МАП бактерии *T. thermophilus* может быть востребован в биотехнологии для удаления метионина из рекомбинантных белков и пептидов в условиях повышенных температур и присутствия денатурирующих веществ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ № 23-24-00563.

Секвенирование и анализ генома бактерии *Christiangramia* sp. KMM 6809, выделенной из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*

Быстрицкая Е.П.¹, Недашковская О.И.¹, Отставных Н.Ю.¹,
Кухлевский А.Д.², Исаева М.П.¹

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

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН
ep.bystritskaya@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38756

Ключевые слова: *Christiangramia*, филогеномный анализ, новый вид.

Род *Christiangramia* (ранее *Gramella*), представитель сем. *Flavobacteriaceae* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidota*, был впервые предложен Nedashkovskaya et al. (2005) с описанием *Gramella echinicola* в качестве типового вида, и недавно нелегитимное название рода *Gramella* было заменено легитимным названием *Christiangramia* (Deshmukh and Oren, 2023). В настоящее время род *Christiangramia* включает 19 валидно опубликованных видов грамотрицательных, аэробных, палочковидных и жёлто-пигментированных морских бактерий, способных передвигаться при помощи скользящего движения (<https://lpsn.dsmz.de/genus/christiangramia>).

Целью настоящего исследования являлась характеристика нового бактериального штамма KMM 6809, который был изолирован из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*, собранной у побережья о. Парамушир в Охотском море.

Клетки штамма KMM 6809 были грамотрицательными, аэробными, гетеротрофными, скользящими, ярко-жёлтыми, палочковидными и каталазо- и оксидазо-положительными. Они росли на питательных средах, содержащих от 0,5 до 15% хлорида натрия, и гидролизовали желатин, крахмал, тирозин, КМ-целлюлозу, ДНК и твины 20, 40 и 80.

Филогенетический анализ, основанный на секвенировании 16S рРНК гена, показал, что ближайшими соседями нового изолята являются типовые штаммы видов *Christiangramia sabulilitoris*, *C. sediminis* и *C. sediminilitoris* со сходством последовательностей рибосомного гена 98,8, 98,8 и 98,7%, соответственно.

Для точного определения таксономического положения штамма KMM 6809 было выполнено геномное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina, США). Прочтения были отфильтрованы по качеству и собраны *de novo* в контиги с помощью SPAdes 3.15.3, аннотация генома была проведена на сервере RAST. Геном KMM 6809 был собран в 37 контигов с N50 равным 1022795 п.н., размер генома был оценен в 3754325 п.н. (полнота 99,25%, контаминация 0,75%), ГЦ-состав – 37,4%.

Анализ, выполненный на сервере dbCAN3, показал, что геном штамма KMM 6809 обогащен генами углевод-активных ферментов (более 5% от общего количества предсказанных белок-кодирующих последовательностей), среди которых наиболее представленными были гликозилтрансферазы. Филогеномный анализ на основе конкатенированных последовательностей 400 консервативных белков поместил штамм KMM 6809 к представителям рода *Christiangramia*. Расчетные геномные показатели ANI, AAI и dDDH между *Christiangramia* sp. KMM 6809 и ближайшими типовыми штаммами *C. forsetii* CGMCC 1.15422^T и *C. sediminis* ASW11-100^T составили 80,7–81,7%, 82,5–83,2% и 27,2–28,2%, соответственно, что ниже пороговых значений для разделения видов.

Полученные данные филогеномного анализа и физиолого-биохимических свойств позволяют предположить, что штамм бактерий KMM 6809 может представлять новый вид рода *Christiangramia*.

Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).

Литература

1. *Deshmukh U.B., Oren A.* Proposal of *Christiangramia* gen. nov., *Neomelitea* gen. nov. and *Nicoliella* gen. nov. as replacement names for the illegitimate prokaryotic generic names *Gramella* Nedashkovskaya et al. 2005, *Melitea* Urios et al. 2008 and *Nicolia* Oliphant et al. 2022, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2023; 73:5806.
2. *Nedashkovskaya O.I., et al.* *Gramella echinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55:391-394.

Иммобилизация клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas putida* и определение их каталазной, оксидазной и нитроредуктазной активности

Вадовская Д.С., Третьякова О.М.

УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»
dankawadovskaya@gmail.com, tretjakova_om@grsu.by

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38757

Ключевые слова: иммобилизация клеток, каталаза, оксидаза, нитроредуктаза, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*.

Изучены методы иммобилизации клеток, их применение в различных отраслях практической деятельности человека, проведено исследование по определению каталазной, оксидазной и нитроредуктазной активности в иммобилизованных в альгинате натрия клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas putida*.

Иммобилизация клеток и ферментов – это широко распространенный в природе феномен, который играет особую роль в стратегии выживания и сохранения максимального числа каталитических функций [1], а встречающиеся в природе агрегаты клеток можно рассматривать как иммобилизованные клетки.

В настоящее время иммобилизованными считают клетки, для которых созданы искусственные ограничения подвижности во внешней среде, а материальный посредник, обеспечивающий ограничение подвижности, считается носителем. В целом система клетка-носитель называется иммобилизованным биокатализатором.

Методы иммобилизации часто рассматриваются с точки зрения природных сил, удерживающих препарат в зоне носителя. В этом случае методы иммобилизации подразделяют на химические, физические и механические.

Химические методы (ковалентное и поперечное связывание) основаны на образовании ковалентных связей между реакционноспособными группами носителя. Обычно используемые бифункциональные реагенты токсичны для живых клеток, поэтому непосредственный контакт клеток с ними нежелателен.

Механические методы иммобилизации основаны на включении микробных клеток в различные гели и мембраны. При включении в гели клетки оказываются заключенными в ячейки полимерной сетки, проницаемой для субстрата, но не для самих клеток.

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация. Методы иммобилизации путем адсорбции основаны на фиксировании фермента на поверхности различных материалов – неорганических (силикагель, пористое стекло, керамика, песок, обожженная глина, гидроокиси титана, циркония, железа) и органических (хитин, целлюлоза, полиэтилен, ионообменные смолы, вспененная резина, полиуретан с ячеистой структурой) [2].

Применение иммобилизованных клеток и их ферментов широко распространено во многих сферах практической деятельности человека:

1. В пищевой промышленности с помощью иммобилизованных клеток и их ферментов получают глюкозо-фруктозные сиропы, L-аминокислоты, распространено получение кормовых пробиотиков для животноводства.

2. В медицине иммобилизованные клетки используют для производства лекарственных препаратов, систем адресной доставки биологически активного компонента к органу-мишени.

3. В системе охраны окружающей среды с помощью иммобилизованных клеток получают биодизельное топливо, а также с их помощью можно очистить сточные воды от различных органических и неорганических загрязнений.

4. Иммобилизованные клетки нашли своё применение в различных аналитических целях: при аффинной хроматографии, иммуоферментном анализе, в биосенсорных системах [3].

Для иммобилизации клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas putida* была выбрана методика стандартной иммобилизации в альгинате натрия [4].

Эффективность каталазы в иммобилизованных клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas putida* оценивали по наличию образованных пузырьков водорода в пробирке с перекисью водорода, что являлось доказательством каталазной активности в данных клетках.

В литературном источнике [5] была исследована проницаемость *Saccharomyces cerevisiae* (пекарских дрожжей) до и после иммобилизации как средство повышения активности каталазы в иммобилизованных дрожжевых клетках. Предварительная проницаемость клеток приводила к значительным потерям активности каталазы во время иммобилизации, но проницаемость после иммобилизации приводила к увеличению активности каталазы частиц дрожжей.

Наличие оксидазной активности свидетельствовало окрашивание 1%-го раствора NN-диметилпарафенилендиаминдигидрохлорида (DMPA) в розовый цвет. Суть метода – поместить несколько частиц с клетками в пробирку с 1 мл DMPA и выдержать в термостате 15 мин при 37 °С. Раствор DMPA поменял цвет на розовый, что доказывает присутствие оксидазной активности в иммобилизованных клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas putida*.

Эффективность опыта, с нитроредуктазной активностью, оценивали по окрашиваю раствора азотистого калия в красный цвет. Для этого в пробирку поместили пару частиц с клетками в пробирку с 1 мл 1%-го раствора азотистого калия. Затем в пробирку внесли 1 мл 1%-го реактива Грисса. Учитывали реакцию на нитриты: в течение 3–5 минут в пробирке с *Pseudomonas putida* появилось светло-красное окрашивание, что указывает о слабой нитроредуктазной активности, а в пробирке с *Saccharomyces cerevisiae* раствор не изменил окраску, что говорит об отсутствии нитроредуктазной активности.

В ходе исследования у иммобилизованных клеток *Saccharomyces cerevisiae* была обнаружена каталазная и оксидазная активности и помимо этого у *Pseudomonas putida* была выявлена слабая нитроредуктазная ферментативная активность.

Литература

1. Антипова Л.В. Прикладная биотехнология. УИРС для специальности 270900: учебн. пособие / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, А.И. Жаринов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. академия, 2000. 332 с.
2. Ефременко Е.Н. Автореф. дисс. докт. биол. наук / Е.Н. Ефременко. Москва: Инст. биохим. физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 2009. 53 с.
3. Крякунова Е.В. Применение иммобилизованных микроорганизмов и ферментов / Е.В. Крякунова А.В. Канарский // Вестник Казанского технологического университета. 2012. № 22. С. 101–105.
4. Желдакова Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.-метод. комплекс для студ. биол. фак. / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин. Минск: БГУ, 2006. 116 с.
5. Optimization of accessible catalase activity in polyacrylamide gel-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.6aaa4344-652d0870-e430b3e9-74722d776562/https/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18601161/ – Дата доступа: 16.10.2023.

Анализ генома и ключевые физиолого-биохимические характеристики *Delftia tsuruhatensis* ULWDIS3 при выращивании на нафталине

Вершинина Д.Д.^{1,2}, Ветрова А.А.¹, Иванова А.А.¹, Сазонова О.И.¹

¹ Пушинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (Росбиотех)»

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»

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

dina-20002001@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38758

Ключевые слова: *Delftia tsuruhatensis*, геном, биodeградация нафталина, *nag*-оперон.

Штамм *Delftia tsuruhatensis* ULwDis3 был выделен из морской воды Финского залива Балтийского моря. Данный штамм способен использовать дизельное топливо и нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), простейшим из которых является нафталин, являются распространенными стойкими загрязнителями, способностью к биodeградации которых обладают гетеротрофные бактерии рода *Delftia*. Однако анализ геномов штаммов рода *Delftia*, доступных в базах данных NCBI и BV-BRC, не выявил штаммов, обладающих генами, кодирующими ферменты разложения нафталина.

Целью данного исследования являлось изучение физиолого-биохимических и генетических характеристик *D. tsuruhatensis* ULwDis3. Для определения геномной последовательности штамма и идентификации генов, отвечающих за деградацию нафталина, проводилось секвенирование геномной ДНК с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore. Установлено, что размер генома штамма ULwDis3 составляет 6944 т.п.н. Собранный геном был аннотирован с помощью Prokka. Он содержит 6404 белок-кодирующих последовательностей, 84 гена тРНК и 5 генов рРНК. С помощью сервиса Kegg (BlastKOALA) провели анализ кластеров ортологичных генов. Из аннотированных 6404 белок-кодирующих последовательностей 3461 имеют определенное функциональное значение, а 2943 CDS относятся к гипотетическим белкам, чья функциональная роль требует более детального изучения.

Хромосома штамма ULwDis3 содержит все гены, необходимые для окисления нафталина через салицилат и гентизат (*nag*-гены) до интермедиатов Цикла Кребса. Эти гены организованы в один оперон и расположены на участке размером 15,8 т.п.н. Оперон содержит 17 генов, *nagAaGHAbAcAdBFCQEDJIKLM*. Последовательность, содержащая регуляторный ген *nagR*, расположена перед *nag*-опероном. Анализ последовательности генома показал наличие трех копий генов, кодирующих гентизат 1,2-диоксигеназу (GDO). Один из трех генов GDO, *nagI*, является частью кластера генов деградации нафталина (*nag*-оперона). Ген, кодирующий вторую гентизат 1,2-диоксигеназу, *GDO2*, расположен на некотором расстоянии выше от *nag*-оперона. Ген *GDO3* является частью третьего кластера, в который также входят гены, предположительно кодирующие 3-гидроксibenzoат-6-монооксигеназу, фумарилпируват гидролазу и малеилпируват изомеразу.

Физиолого-биохимические характеристики штамма ULwDis3 изучались при культивировании в минеральной среде с нафталином, сукцинатом, салицилатом или гентизатом в качестве единственного источника углерода и энергии. В процессе культивирования на средах с нафталином и сукцинатом определяли активность ферментов NO (нафталин 1,2-диоксигеназа), S5H (салицилат 5-гидроксилаза) и GDO.

Исследуемый штамм был способен не только к росту на нафталине, но и к его разложению (около 40%). В ходе *lag*-фазы не происходило потребления нафталина. На экспоненциальную фазу приходился максимальный уровень его потребления. Накопление ключевого метаболита пути разложения нафталина, салицилата, наблюдалось до 19 ч. Затем было обнаружено снижение концентрации накопленного салицилата и образование небольшого количества гентизата, который быстро потреблялся культурой. Помимо следовых количеств салицилата и гентизата, никаких других метаболитов при выращивании этого штамма на нафталине обнаружено не было.

Анализ ферментативных активностей показал, что максимальные активности NO, S5H и GDO были обнаружены во второй половине экспоненциального роста (21,5 ч) штамма на нафталине. К концу экспоненциальной фазы (22,5 ч) наблюдали снижение активности нафталин 1,2-диоксигеназы, при этом активность салицилат 5-гидроксилазы все еще находилась на высоком уровне. С момента гибели культуры активности NO и S5H не детектировались. Активность гентизат 1,2-диоксигеназы была обнаружена с момента образования гентизата до гибели культуры (табл. 1). При выращивании ULwDis3 на сукцинате активность S5H отсутствовала, активность NO была низкой. Значения активности GDO были близки к значениям GDO в первой половине экспоненциальной фазы роста на нафталине.

Таблица 1

Активность ключевых ферментов деградации нафталина

Субстрат	Время, ч	Ферментативная активность, $\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1}$		
		Нафталин 1,2-диоксигеназа	Салицилат 5-гидроксилаза	Гентизат 1,2-диоксигеназа
Нафталин	18.5	11	<1	32
	21.5	49	1148	269
	22.5	16	858	2110
	25.5	<1	<1	251
	27.5	<1	<1	77
Сукцинат		13	<1	48

При культивировании штамма ULwDis3 в жидкой минеральной среде с салицилатом наблюдалось увеличение адаптационной фазы в зависимости от концентрации салицилата в среде. При выращивании штамма в среде с гентизатом в качестве единственного источника углерода и энергии отсутствовал период адаптации, а продолжительность фазы экспоненциального роста составила 2 часа.

Примечательно, что при культивировании штамма в жидкой минеральной среде с нафталином не наблюдалось стационарной фазы роста, а за экспоненциальной фазой сразу следовала фаза отмирания. Когда бактерии выращивали в жидкой среде с различными концентрациями салицилата или гентизата, то в течение 48 ч после экспоненциальной фазы наблюдалась стационарная фаза роста (количество живых клеток оставалось на уровне 10^8 КОЕ/мл).

Антагонистическая роль ассоциативной микрофлоры на примере индигенного сообщества *Parasalmo mikiss*

Германова М.А., Сидорова Н.А.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»
marinagermanova12@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38759

Ключевые слова: антагонизм, ассоциативная микрофлора, условно-патогенные микроорганизмы, восприимчивость, вирулентность, устойчивость, радужная форель.

Согласно современным представлениям о структурных особенностях симбиотической системы, одной из важных форм взаимоотношений между макро-и микроорганизмом является антагонистический симбиоз.

Он представляет собой сложную систему, состоящую из хозяина, доминантных видов микроорганизмов и ассоциативных симбионтов, участвующих в формировании, поддержании стабильности и продуктивности симбиоза. Представителями ассоциативного сообщества часто выступают условно-патогенные микроорганизмы, которые в случае снижения резистентности макроорганизма, часто приводят к нарушениям функционирования всего микробиома с последующим развитием инфекционного процесса, заканчивающегося инфекционным заболеванием (Бухарин, 2010). На исход инфекционного заболевания, наряду с восприимчивостью и устойчивостью организма хозяина, большое влияние оказывает вирулентность. При этом одним из показателей вирулентности служит соотношение гуанина и цитозина в генетической структуре бактерий. Вирулентность определяет также способность микробов к инвазии (проникновению в ткани) и к пенетрации (воздействию на чувствительные клетки макроорганизма) (Караулов с соав., 2018). Характерными свойствами условно-патогенных микробов являются: специфичность (способность вызывать определённые патологические состояния) и органотропность (способность поражать определённые органы и ткани). Восприимчивость макроорганизма определяется в основном целостностью анатомо-физиологического барьера и наличием социальных факторов, обеспечивающих алиментарный путь передачи возбудителя (включая передачу через воду, пищу и физический контакт). Кишечный микробиом является одним из наиболее значимых факторов формирования адаптивного иммунитета и неспецифической резистентности макроорганизма к средовым факторам различной природы. Наряду с увеличением стрессогенной нагрузки, увеличивается количество условно-патогенных бактерий в составе индигенной микрофлоры. Это обуславливает общую тенденцию микропопуляции к нарушениям баланса эубиоза – состояниям дисбактериоза.

Согласно сказанному, цель выполненного исследования была направлена на изучение биохимических и физиологических особенностей представителей ассоциативной микрофлоры ЖКТ *Parasalmo mikiss* и анализ антагонистической активности доминантных видов.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели, в качестве модели изучения ассоциативного симбиоза рассмотрены бактериозы *Parasalmo mykiss*, как результат отношений в системе «паразит-хозяин». Выполнено определение состава микрофлоры кишечника экспериментальных групп радужной форели возрастной группы 1+. Для выполнения микробиологического анализа использованы общепринятые подходы к исследованию качественного и количественного биоразнообразия кишечного микробиома [Ткачева, 2019] с учетом «Правил отбора патологического материала, крови, корма и пересылки их для лабораторных исследований» [Департамент ветеринарии, Межведомственная ихтиологическая комиссия Департамента рыболовства Минсельхозприрода России, 1998]. Предварительно рыбу анестезировали гвоздичным маслом и проводили патологоанатомический осмотр. Из ЖКТ рыбы в условиях строгой асептики отбирали часть средней кишки длиной 10 мм и помещали в пробирки с забуференной пептонной водой для неселективного накопления бактерий, включая сублетально угнетенных энтеробактерий. Идентификацию бактерий до вида выполняли с использованием ПЦР-анализа, выполненного методом секвенирования ДНК по Сэнгеру. В качестве биохимических признаков выделенных культур использовали наличие группы конститутивных и индуцибельных ферментов, включая каталазу, цитохромоксидазу, гидролазы и сахаролитические ферменты. Параллельно оценивали физиологическую активность изолятов, связанную со способностью колонизировать энтероциты форели и формировать биоплёнку, препятствующие рациональной антибиотикотерапии.

Результаты

Изучено состояние макроорганизма и среди клинически здоровых особей обнаружены экземпляры с признаками явных поражений в виде язв, некроза тканей, гиперемии у основания плавников (27%). В результате изучения микробиома кишечника форели описаны Actinobacteria, Bacillota, Proteobacteria. Генотипированы представители 26 родов с преобладанием в составе совокупного микробиома желудочно-кишечного тракта радужной форели 14 видов домена Bacteria, типа Firmicutes, класса Bacilli, порядка Bacillales, семейства Bacillaceae, рода *Bacillus*. Благодаря использованию сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, как дополнительного критерия для дифференциации видов в пределах рода получена объективная информация о таксономической принадлежности природных штаммов гетерогенной группы *Bacillus* в составе микробиома желудочно-кишечного тракта радужной форели, как группы микроорганизмов, обладающей большим спектром вариативности известных морфологических и физиолого-биохимических признаков. К доминантным представителям домена отнесены *Pseudomonas spp.*

(12.2%), *Proteus spp.* (6.2%), *Enterococcus spp.* (4.9%), *Klebsiella spp.* (4.8%). Доказано, что перечисленные представители обладают гиалуронидазной, коагулазной и биопленкообразующей активностью. По результатам оценки гликолитической и протеолитической активности обнаружена способность представителей условно-патогенной микрофлоры к сбраживанию сахаров, одноатомных спиртов и аммонификации. Как правило, возбудители бактериозов форели массово обнаруживались во время изменений окружающей среды, стрессов, изменения температуры, а также при увеличении концентрации в водоеме легкоокисляемой органики. В условиях развития инфекционного процесса в составе кишечного микробиома форели исследуемой возрастной группы, оставался стабильным филум Bacilota на уровне 11%, уменьшалась доля в сообществе представителей Proteobacteria до 6%, а доля Actinobacteria возрастала до 15%. В результате выполненного исследования получены первичные данные по состоянию индигенной микрофлоры форели, которая способна оказывать антагонистический эффект по отношению к условно-патогенным видам – возбудителям бактериозов. Результаты анализа антагонистической активности доминантных видов необходимы для формирования объективной научной базы с целью установления причинно-следственных закономерностей становления межмикробных взаимоотношений в природных биоценозах.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

Литература

1. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // КМАХ. 2010. № 4.
2. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомиальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей / А.В. Караулов [и др.] // Астраханский медицинский журнал. 2018. № 2.

Получение рекомбинантного лентивируса, содержащего ген NGF для терапии нейродегенеративных заболеваний

Голубенко М.А., Салафутдинов И.И., Архипова С.С., Яковлева А.С.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии
golubenkomasha@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38760

Ключевые слова: лентивирус, фактор роста нервов, нейродегенеративные заболевания, иммуноцитохимия, трансфекция, трансдукция, плазмиды, рассеянный склероз.

Введение

Генетическая модификация является многообещающим терапевтическим направлением для лечения таких нейродегенеративных заболеваний, как рассеянный склероз (РС), боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Альцгеймера (БА). NGF, или фактор роста нервов, выступает в качестве потенциально перспективной в терапии молекулы, способной стимулировать нейрорегенерацию при данных заболеваниях. Однако, в чистом виде NGF показал цитотоксичность для организма в предыдущих исследованиях [4]. Мы предлагаем создание препарата на основе микровезикулярной фракции эукариотических клеток, содержащей NGF [1]. Разработка данного препарата на одном из этапов предполагает создание генно-модифицированных эукариотических клеток со сверхэкспрессией NGF.

На данный момент большое распространение в генно-инженерных разработках получили векторы на основе лентивирусов [2]. Лентивирусы представляют собой подгруппу ретровирусов, которые могут эффективно доставлять в неделящиеся клетки трансгены и обеспечивать их долгосрочную экспрессию. Лентивирусные векторы с NGF могут быть ориентированы на различные клеточные линии.

В настоящее время ведутся работы по псевдотипированию ретровирусных векторов – замене гликопротеинов вирусной оболочки ретровирусов на гликопротеины других вирусов, таких как вирус везикулярного стоматита (*англ.* Vesicular stomatitis virus, VSV), что позволяет трансдуцировать широкий спектр клеточных линий [2].

Целью настоящего исследования является получение рекомбинантного лентивируса, несущего ген NGF, с помощью штаммов бактериальных клеток и пакующей линии эукариотических клеток.

Материалы и методы

Плазмиды, использованные в работе, были получены из некоммерческой организации AddGene: оболочечная плаزمида pMD2.G (плазмида №12259), упаковочная плазмида psPAX2 (плазмида №12260) и векторная плазмида pLX-NGF. Карты плазмид можно найти на сайте организации AddGene (www.addgene.org). Для генетической трансформации бактериальных клеток использовались клетки *E. coli* штамма TOP10 (Invitrogen, США). Клетки культивировались в питательную среду LB (среда мало солевая Лурия-Бертани). Далее была проведена генетическая трансформация клеток *E. coli* CaCl₂ методом тремя вышеуказанными генетическими конструкциями [2]. В результате были получены 3 чашки Петри с селективной средой, содержащие колонии модифицированных бактерий с экспрессией плазмид pMD2.G, psPAX2 и pLX-NGF.

Далее бактерии каждого из 3-х видов были инокулированы в колбу, содержащую по 200 мл среды LB с ампициллином и инкубировались в термостате в течение 14–16 часов при 37 °С с интенсивным перемешиванием на шейкере (300 об/мин), после чего биомассу использовали для выделения плазмидной ДНК.

Плазмидную ДНК из бактериальных клеток выделили с помощью набора Eurogen Plasmid Midi Prep (Eurogen, США) по методике, рекомендуемой производителем (<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC124.pdf>). После чего был проведен электрофорез в агарозном геле по стандартной методике с использованием ДНК-маркера GeneRuler DNA™ Ladder Mix, результаты проанализировали с помощью трансиллюминатора [2].

Для получения рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса была проведена ко-трансфекция тремя плазмидами (оболочечная, упаковочная и векторная) пакующей линии клеток HEK293T. Клетки HEK293T поддерживались на среде DMEM (от *англ.* Dulbecco's Modified Eagle Medium, модифицированная Дульбекко Invitrogen), с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (от *англ.* Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma), 2 мМ L-глутамин (Sigma), смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (Sigma) [3]. Трансфекция была произведена согласно стандартному протоколу, после чего был собран супернатант, содержащий лентивирус [2]. По завершению сбора супернатанты очищены и сконцентрированы.

Эффективность получения необходимой лентивирусной конструкции, содержащей NGF, была проверена путем трансдукции здоровой эукариотической линии клеток HEK293T, последующего фиксирования и проведения иммуноцитохимии с использованием антител к NGF в концентрации 1:200 и конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии.

Результаты и выводы

Для наработки необходимого количества плазмид – составляющих лентивирусный вектор – была проведена генетическая трансформация бактериального штамма *E. coli* TOP10, выделение и очистка плазмид. Электрофорез показал содержание в супернатанте фрагментов ДНК массой 10 700 п.н., 5800 п.н., 9500 п.н., что соответствует плазмидам psPAX2, pMD2.G, и pLX-NGF. В результате проведенной работы была получена рекомбинантная лентивирусная конструкция, несущая целевой ген NGF, которая в дальнейшем может применяться для генной модификации эукариотических клеток. Конфокальная сканирующая флуоресцентная микроскопия выявила высокий уровень экспрессии NGF клетками, модифицированными полученной лентивирусной конструкцией, что говорит о возможности создания эукариотических клеток со сверхэкспрессией NGF с помощью разработанной конструкции.

Литература

1. Kim F.J., et al. Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. *Virology*, 2004. 318(1): p. 183–91.
2. Ризванов А.А. Получение рекомбинантного лентивируса на основе Вич-1 для тестирования противовирусных препаратов. Методическое пособие, 2013, Казань.
3. Соловьева В.В. Выделение, культивирование и биохимический анализ первичных клеток человека: учеб. пособие / В.В. Соловьева, Л.Г. Тазетдинова, А.А. Ризванов. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. 114 с.
4. Wu X. and S.M. Burgess. Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2588–96.

Паттерны первичных метаболитов экстремофильных цианобактерий

Голушко Н.И.¹, Билова Т.Е.^{1,2}, Фролов А.А.², Фролова Н.В.², Соболева А.В.²,
Орлова А.А.², Силинская С.А.², Синетова М.А.², Лось Д.А.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

st078415@student.spbu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38761

Ключевые слова: цианобактерии, экстремофилы, метаболомика.

Цианобактерии – одни из древнейших организмов на Земле, встречающиеся в различных средах обитания. Штаммы, обитающие в экстремальных условиях, таких как термальные источники, содовые озера, месторождения солей, называются экстремофилами. Уникальная способность метаболизма этих цианобактерий поддерживать протекание биохимических процессов в экстремальных условиях обитания делает данные организмы интересными для физиологов растений и перспективными моделями для исследования молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование устойчивости к абиотическим факторам.

В данной работе было выполнено сравнительное исследование первичных метаболитов 12 различных штаммов экстремофилов с целью выявления паттернов метаболитов характерных для цианобактерий, заселяющих определенные экстремальные экологические ниши. Для анализа первичного метаболома цианобактерий был использован ненаправленный метаболомный метод с применением газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Исследованы высушенные полярные экстракты метаболитов после их последовательной двухэтапной дериватизации метоксиамин гидрохлоридом и триметилсилилирующим агентом. Идентификация аналитов основывалась на сравнении хромато-масс-спектрометрической информации, полученной в эксперименте и зарегистрированной для стандартных веществ, анализируемых одновременно с экспериментальными пробами, а также с ГХ-МС информацией известных масс-спектрометрических библиотек. Всего было детектировано около 420 аналитов, из которых удалось структурно аннотировать 127 соединений – представителей разных химических классов (органические кислоты, углеводы, аминокислоты, полиамины, азотистые основания и др.). Метод главных компонент показал значительные различия в метаболомном составе цианобактерий галоалкалофилов от штаммов устойчивых к высыханию, воздействию низких и высоких температур. Интересно, что паттерны метаболитов всех исследуемых штаммов галоалкалофилов также значительно различались между собой, тогда как у штаммов, устойчивых к обезвоживанию и термофилов паттерны метаболитов оказались схожими. Эти результаты позволяют предположить значительно большую вариабельность механизмов формирования адаптаций у цианобактерий галоалкалофилов по сравнению с другими исследуемыми экстремофилами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-44-00101.

Видовой состав бактериальных изолятов, ассоциированных с зернобобовыми культурами Алтайского края

Игнатъева И.М., Кононова Е.П.

Всероссийский центр карантина растений ФГБУ «ВНИИКР»
babiraigirmi@ya.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38762

Ключевые слова: *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, секвенирование, MALDI-TOF.

В рамках научного обследования посевных площадей зернобобовых культур в июне 2021 г. и в июле 2023 г. на территории Алтайского края осуществлен отбор растительного материала растений-хозяев возбудителя ржаво-бурой пятнистости сои *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (далее *Cff*), возбудителя угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (далее *Psp*), возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (далее *Ppi*) и возбудителя бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (далее *Xaph*). Целью исследования послужило применение методов выявления фитопатогенов из растительных экстрактов для дальнейшего определения видового состава бактериальных изолятов, ассоциированных с зернобобовыми культурами Алтайского края, и пополнения коллекции бактериальными штаммами.

Всего было отобрано 50 образцов вегетативных частей растений вики, гороха, козлятника, люцерны, нута, сои, фасоли, чечевицы, эспарцета (30 растительных экстрактов в 2021 г. и 20 растительных экстрактов в 2023 г.). Для совместного выявления возбудителей болезней зернобобовых из растительных экстрактов проведена изоляция на универсальных питательных средах King B и YPGA (Игнатъева и др., 2022). Учитывая разнообразие морфотипов колоний, изолированы 69 бактериальных колоний. ДНК бактериальных культур использованы для ПЦР-тестирования с праймерами 8UA/519B, задачей которого является получение ампликонов для секвенирования по Сэнгеру (Белкин, 2019). Наличие ампликонов и их качество определялось с помощью геледокументирующей системы (BioRad, США) после электрофореза продуктов реакции в 1,5%-м агарозном геле. Секвенированы ампликоны длиной 500 н.п., результаты секвенирования обработаны с помощью программы BioEdit. Расшифрованные нуклеотидные последовательности сопоставлены с помощью сервиса BLAST с последовательностями, размещенными в GenBank. После идентификации последовательностей определено происхождение 62 изолятов. Дополнительно с помощью масс-спектрометрического метода анализа (далее MALDI-TOF) определена таксономическая принадлежность бактериальных изолятов на основе созданной базы данных белковых профилей карантинных и приоритетных экспортных видов бактерий в лаборатории бактериологии испытательного лабораторного центра Всероссийского центра карантина растений ФГБУ «ВНИИКР». Анализ MALDI-TOF может применяться в качестве дополнительного способа экспресс-идентификации чистых бактериальных культур, полученных в ходе изоляции из растительных образцов (Portier et al., 2023; Методические рекомендации, 2023).

В результате идентификации бактериальных изолятов обнаружены представители 25 различных родов – *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Clavibacter*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Kocuria*, *Leucobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Peribacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rathayibacter*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*. Изолятам, относящимся к родам *Curtobacterium*, *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, представляющих наибольший интерес для исследования, присвоены коллекционные номера в бактериологической коллекции Всероссийского центра карантина растений ФГБУ «ВНИИКР».

Собранная коллекция живых бактериальных изолятов в дальнейшем может быть использована при разработке новых ПЦР-тестов (проверка схожести геномов бактерий-объектов исследования и компонентов бактериальной микробиоты зернобобовых культур, близких объектам исследования генетически) и оценке наличия перекрестных реакций при ПЦР-идентификации объектов исследования (Словарёва и др., 2023). Штаммы остальных родов, выявленных в процессе исследования, могут быть использованы при разработ-

ке методов выявления и идентификации других видов бактерий, значимых для экспорта российской продукции.

Литература

1. *Игнатъева И.М.* Применение методов диагностики растительных экстрактов зернобобовых культур на наличие возбудителя бактериального ожога гороха / И.М. Игнатъева, Е.П. Кононова, Д.А. Доморацкая // VIII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: Сборник тезисов докладов. Посвящается памяти выдающегося ученого-микробиолога Льва Владимировича Калакуцкого, Пущино, 06–08 декабря 2022 года / Под редакцией Т.А. Решетиловой. М.: ООО «Издательство ГЕОС», 2022. С. 140–141. DOI 10.34756/GEOS.2022.17.38328. – EDN EQMADW.
2. *Белкин Д.Л.* Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов / Д.Л. Белкин, Г.Н. Бондаренко, А.Б. Яремко, Д.А. Уварова // Карантин растений. Наука и практика. 2019. Т. 2(28). С. 31–34.
3. *Portier P.* Rapid identification of plant-health related bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI-ID) / P. Portier, J. van der Bilt, A. Wensing. Zenodo: 2023. DOI 10.5281/zenodo.7669147.
4. Методические рекомендации по выявлению и идентификации ржаво-бурой пятнистости сои *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ((Hedges) Collins & Jones). Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»). Быково: 2023. 47 с. Инв. №49-2019 МР ВНИИКР (2-я редакция).
5. Выявление значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов и комплекса сопутствующих микроорганизмов в посевах зерновых культур (на примере Тимирязевской полевой опытной станции) / О.Ю. Словарева, М. Мувинги, А.Б. Яремко, В.Н. Игонин, В.С. Рубец // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58. № 1. С. 184–199. DOI 10.15389/agrobiology.2023.1.184rus.

Выделение и характеристика бактериальных штаммов с выраженным биотехнологическим потенциалом

Иминова Л.Р.^{1,2}, Делеган Я.А.², Поливцева В.Н.², Абашина Т.Н.²,
Сузина Н.Е.², Соляникова И.П.²

¹ Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

² ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
uzdleila90@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38763

Ключевые слова: биоремедиация, бактерии-деструкторы, биотехнология очистки, рекультивация.

В последние годы значительно возросло техногенное воздействие промышленного комплекса на экосистемы. Объекты окружающей среды подвергаются все более возрастающему загрязнению токсичными веществами, в том числе нефтью и ее компонентами, нефтепродуктами, фенолом и его производными, пестицидами и иными загрязнителями. Одним из перспективных направлений ликвидации подобных загрязнений является использование микроорганизмов с высоким биотехнологическим потенциалом. Загрязненная почва является уникальным источником для выделения бактерий, способных к деградации. Бактерии родов *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Bacillus*, выделенные из различных природных источников, способны к деградации токсичных соединений с высокой скоростью при высокой солености очищаемой среды и широком диапазоне температур, что делает их перспективными при разработке биотехнологий (Поливцева с соавт., 2020; Vera et al., 2017; Kumar et al., Liu et al., 2020).

Целью данной работы были поиск и выделение в чистую культуру бактерий, способных к деструкции целевых соединений, относящихся к приоритетным загрязнителям окружающей среды, определение их биodeградативной активности и оценка возможности применения выделенных штаммов в качестве основы для разработки биопрепаратов.

Методом накопительного культивирования из образцов загрязненных и незагрязненных земель были выделены изоляты, способные к деструкции фенола, бензоата, нафталина, этилбензола, углеводов нефти, пестицидов, толуола, изопрена, а также хлорорганических соединений. Более 150 выделенных культур были проверены на способность использовать эти соединения в качестве единственного ростового субстрата в минеральной среде, при концентрации в среде фенолов от 0,1 г/л до 3,0 г/л, нефти 1–2%, пиноксадена и толуола до 0,5%. 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 была определена способность накапливать биомассу при повышенной солености среды в широком диапазоне температур (от 25 °С до 55 °С).

Нами было отобрано 7 штаммов, которые являются эффективными деструкторами ряда целевых загрязнителей, исследованы их субстратные возможности, а также способность к стимуляции роста растений.

В ходе исследования было показано, что штамм *Rhodococcus* sp. 7B способен к утилизации фенола в концентрации 2 г/л и нефтепродуктов в концентрации до 2%, при 10% солености среды при температурах от 28 °С до 55 °С. При культивировании на сырой нефти и дизельном топливе штамм *Rhodococcus* sp. 7B разлагал эти соединения на 63,8% и 42% соответственно. Исследуемый штамм рос в питательной среде, единственным источником энергии и углерода в которой являлось моторное масло. Показано, что для него характерно ростостимулирующее действие по отношению к таким растениям, как рожь, пшеница, картофель.

В процессе работы выяснен ряд особенностей выделенных бактерий. Так, впервые для рода *Exiguobacterium* было показано, что штамм *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex1 активно деградирует углеводороды при 28 °С и солености 11%, а также обладает ростостимулирующими свойствами по отношению к растениям. Штамм *Pseudomonas* sp. 8/1C способен к утилизации фенола в концентрации до 2 г/л и пиноксадена в концентрации до 0,5%. Культуры, *Stenotrophomonas* sp. Fch 5 и *Lysinibacillus* sp. Fg1, выделенные из ризосферы растений, показали способность к деструкции более чем 15 различных соединений, в том числе относящихся к стойким органическим загрязнителям. Определено, что культура *Acinetobacter pittii* 2A способна расти на минеральной среде с концентрацией фенола до 2,5 г/л.

Для культур *Rhodococcus* sp. 7B и *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex1 проведено полногеномное секвенирование.

Для всех изолятов определены как оптимальные, так и возможные условия культивирования и применения, что значительно облегчает их культивирование и как следствие масштабирование полученных результатов. Все штаммы были проверены на токсичность с использованием дафний в качестве тест-объекта.

Таким образом, в результате проведенной работы выделены новые бактерии-деструкторы, способные к деградации целого ряда токсичных органических соединений. Более 20 штаммов депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов ИБФМ РАН, 6 бактерий переданы на полевые испытания. Широкий спектр утилизируемых штаммами субстратов является основой для создания биопрепаратов, перспективных для биоремедиации почв, подвергшихся воздействию тех или иных токсичных поллютантов в широком диапазоне температур при высокой солености очищаемой среды.

Литература

1. Поливцева В.Н., Анохина Т.О., Иминова Л.Р., Борзова О.В., Есикова Т.З., Соляникова И.П. Оценка биотехнологического потенциала новых штаммов-деструкторов фенола // Прикладная биохимия и микробиология, 2020, том 56, № 3, с. 257–265.
2. Bera S., Abhijit Sarma Roy A.S., Mohanty K. Biodegradation of phenol by a native mixed bacterial culture isolated from crude oil contaminated site // International Biodeterioration & Biodegradation. 2017. V. 121, P. 107–113.
3. Kumar D.R., Kumar S., Kumari A., Panwar A. Biodegradation of phenol-rich sewage water using indigenous bacterial consortium: a laboratory- to plant-scale study // International Journal of Environmental Science and Technology. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04892-y>
4. Liu Y., Wang W., Shah S.B., Zanolli G., Xu P., Tang H. Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. V. 104. P. 427–437.

Методы математического и компьютерного моделирования в исследовании метаболизма L-аминокислот бактерии *C. glutamicum*

Казанцев Ф.В.^{1,2,3}, Трофимова М.Ф.^{2,3}, Клименко А.И.^{1,2,3}, Лашин С.А.^{1,2,3}

¹ Институт Цитологии и Генетики СО РАН

² Курчатовский геномный центр ИЦИГ СО РАН

³ Новосибирский государственный университет
kazfdr@bionet.nsc.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38764

Ключевые слова: Поточковые модели, FBA, моделирование, L-аминокислоты.

В промышленном производстве аминокислот с помощью микробиологического синтеза одной из важных биотехнологических задач является оптимизация выхода целевого продукта, а также снижение издержек. Повышение доступности технологий расшифровки геномов микроорганизмов расширило арсенал методов решения задач такой оптимизации за счёт подходов системной биологии и компьютерного моделирования. Информация о потенциальной экспрессии генов, кодирующих ферменты, позволяет строить метаболические сети бактериальной клетки, что, в свою очередь, позволяет оценивать перспективность целевых штаммов и новых метаболических путей, снижая затраты на проведение массовой экспериментальной работы.

В данной работе мы с помощью методов математического моделирования исследуем метаболизм бактерии *Corynebacterium glutamicum*, которая широко используется в биотехнологической промышленности как продуцент аминокислот. Метод моделирования баланса потоков (FBA – Flux balance analysis), используемый в данной работе, широко используется в исследовании метаболизма при решении биотехнологических задач. На сегодняшний момент существует не менее 5 полногеномных потоковых математических моделей различных штаммов *C. glutamicum* (systemsbiology.ucsd.edu/InSilicoOrganisms/OtherOrganisms). В литературе имеется информация о десятках штаммов *C. glutamicum* с измеренными параметрами выхода целевых метаболитов, средами культивирования, описанием изменений в геномах, а также сами геномные последовательности этих штаммов.

С помощью разработанных нами ранее методов полуавтоматической реконструкции потоковых моделей метаболизма получены модели 3 штаммов для анализа. Для их исследования нами реализованы программные модули на языке программирования Python (среда разработки и исследования моделей – Jupyter lab; и библиотеки *cobraPy* и *Pandas*). Визуализация структуры метаболических путей и отображение результатов анализа выполняется с помощью программы *Escher* (escher.readthedocs.io). Создана серия вычислительных протоколов: (1) по оценке уровня экскреции метаболитов на различных питательных средах и источниках углерода; (2) по оценке перспективных мутаций; (3) протоколы сравнения пространства решений моделей разных штаммов в оценке перспективных точек направленных мутаций.

С использованием разработанных программных инструментов выявлена серия мутаций, которые потенциально приводят к повышению экскреции L-валина. Разработанные инструменты могут быть использованы для исследования эффективности экскреции других целевых аминокислот.

Исследование поддержано Курчатовским Геномным Центром ИЦИГ СО РАН (075-15-2019-1662).

Новый способ получения каспазы-3

Калинин Д.С.¹, Рабушко Е.Н.², Майоров С.Г.², Холод Н.С.²,
Шляпников М.Г.², Грановский И.Э.^{1,2}

¹ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

² ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
iegranovsky@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38765

Ключевые слова: апоптоз, каспаза-3, продукция, способ получения.

Апоптоз – один из видов программируемой клеточной гибели – является ключевым процессом в развитии и жизнедеятельности многоклеточных организмов. Он отвечает за поддержание гомеостаза в эмбрио- и онтогенезе, за нормальное развитие нервной и иммунной систем. Результатом нарушения апоптоза является возникновение различных патологических состояний. Так, неконтролируемый апоптоз приводит к развитию целого ряда нейродегенеративных заболеваний. Инактивация апоптоза – одна из основных причин развития онкологии и возникновения лекарственной устойчивости раковых клеток.

Каспаза-3 – представитель семейства цистеиновых протеаз – центральный участник апоптоза. Она синтезируется в клетках в виде неактивного предшественника, прокаспазы-3, после активации которой процесс апоптоза приобретает необратимый характер. Каспаза-3 расщепляет большинство субстратов апоптогического каскада. Кроме того, каспаза-3 играет ключевую роль в активации провоспалительных цитокинов, в процессе дифференциации миоцитов, сперматогенезе и ряде других жизненно важных процессов. В связи с этим активация каспазы-3 в клетках исследуется при разработке и тестировании новых лекарственных препаратов. Наборы для детекции и измерения ее активности применяются в различных молекулярно-биологических, биохимических и медицинских исследованиях.

К настоящему моменту предложено несколько способов получения препарата каспазы-3. Они основаны на продукции активной формы фермента, ренатурации неактивных субъединиц или активации химерной прокаспазы-3 тромбином. Недостатками этих подходов являются токсичность для штамма-продуцента, низкие выход и качество препарата, и, как следствие его дороговизна.

Известно, что в клетках млекопитающих активность каспазы-3 ингибируется белком XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), а именно его доменом Bir2. Мы установили, что при ко-экспрессии прокаспазы-3 и Bir2 домена в клетках *E. coli* происходит ингибирование автокаталитического процессинга и созревания профермента и наблюдается суперпродукция прокаспазы-3. На основании этого мы разработали новый простой двухстадийный способ получения ферментного препарата каспазы-3. На первой стадии прокаспазы-3, слитая с олигогистидиновой метоксой, нарабатывается совместно с доменом Bir2 белка XIAP в бактериальной культуре. Далее белковый комплекс иммобилизуется на металл-хелатном носителе Ni-NTA, и затем разрушается на хроматографической стадии в специально подобранных условиях. После элюции с сорбента, в отсутствие белка Bir2, очищенная прокаспазы-3 катализирует собственный процессинг *in vitro* и переход в активную форму, каспазу-3.

Таким образом, нами разработан новый простой, продуктивный, эффективный и дешевый способ получения широко востребованного в биологических и медицинских исследованиях ферментного препарата каспазы-3.

Аэробные метиловобактерии из Соль-Илецких озер

Капарулина Е.Н.¹, Шустова М.Н.^{1,2}, Агафонова Н.В.¹, Доронина Н.В.¹

¹ ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН

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

² Пушинский филиал Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ)

shusstovaa@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38766

Ключевые слова: метанол, метилотрофы, галофильные микроорганизмы.

Аэробные метиловобактерии – группа прокариот, использующих в качестве источников углерода и энергии C₁-соединения – метанол, метиламин и другие окисленные или замещенные производные метана, но не метан. Они играют важную биосферную роль, обнаруживаются в различных биотопах и представляют биотехнологический интерес для целей биосинтеза, биокатализа, биодеградации и на биосенсорах. Метиловобактерий из Соль-Илецких озер (Оренбургская область) ранее не выделяли.

Цель работы – выделение чистых культур метиловобактерий из Соль-Илецких озер и определение их филогенетического положения.

Объектами исследований служили штаммы аэробных метиловобактерий, выделенные из проб воды и ила, отобранных из озер на территории г. Соль-Илецка. Из пресного Большого городского озера на минеральной среде с 0.05% NaCl (вес/об) и 1% CH₃OH выделен штамм 1Sol (табл.).

Таблица

Аэробные метиловобактерии из Соль-Илецких озер

Источник выделения	Минерализация (%)	Штамм	Филогенетическое положение на основании секвенирования гена 16S рНК
Большое Городское озеро	10	1Sol	99.7% <i>Methylophilus quaylei</i> MT ^T
Малое Городское озеро	285	2Sol	99.73% <i>Idiomarina loihiensis</i> L2-TR ^T (<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Alteromonadales</i> ; <i>Idiomarina</i>)
Озеро Дунино	300	3Sol	99.72% <i>Halomonas titanicae</i> BH1 ^T (<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Oceanospirillales</i> ; <i>Halomonadaceae</i> ; <i>Halomonas</i>)
Озеро Новое	110	B-5 Sol	99.86% <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T (<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Oceanospirillales</i> ; <i>Halomonadaceae</i> ; <i>Halomonas</i>)

Из Соль-Илецких соленых озер, представляющих собой уникальные экосистемы, характеризующиеся слабощелочными значениями pH и высоким содержанием солей, в основном хлорида натрия, на минеральной среде с 3% NaCl (вес/об) и 1% CH₃OH выделены штаммы 2Sol, 3Sol и B-5 Sol (табл.). Чистоту культур проверяли по однородности колоний, выросших на агаризованных средах с метанолом или глюкозой/пептоном с 3% NaCl (вес/об), а также световой микроскопией. Филогенетическое положение штаммов определяли известными методами (Агафонова et al., 2020).

По данным секвенирования генов 16S рНК все изоляты отнесены к известным видам. Негалофильный облигатный метилотроф (не растет на богатых средах) 1Sol характеризуется высокой скоростью роста на среде с метанолом и имеет 99.7% с *Methylophilus quaylei* MT^T. Представители рода *Methylophilus* широко распространены и выделяются из почв, активных илов и пресных водоемов.

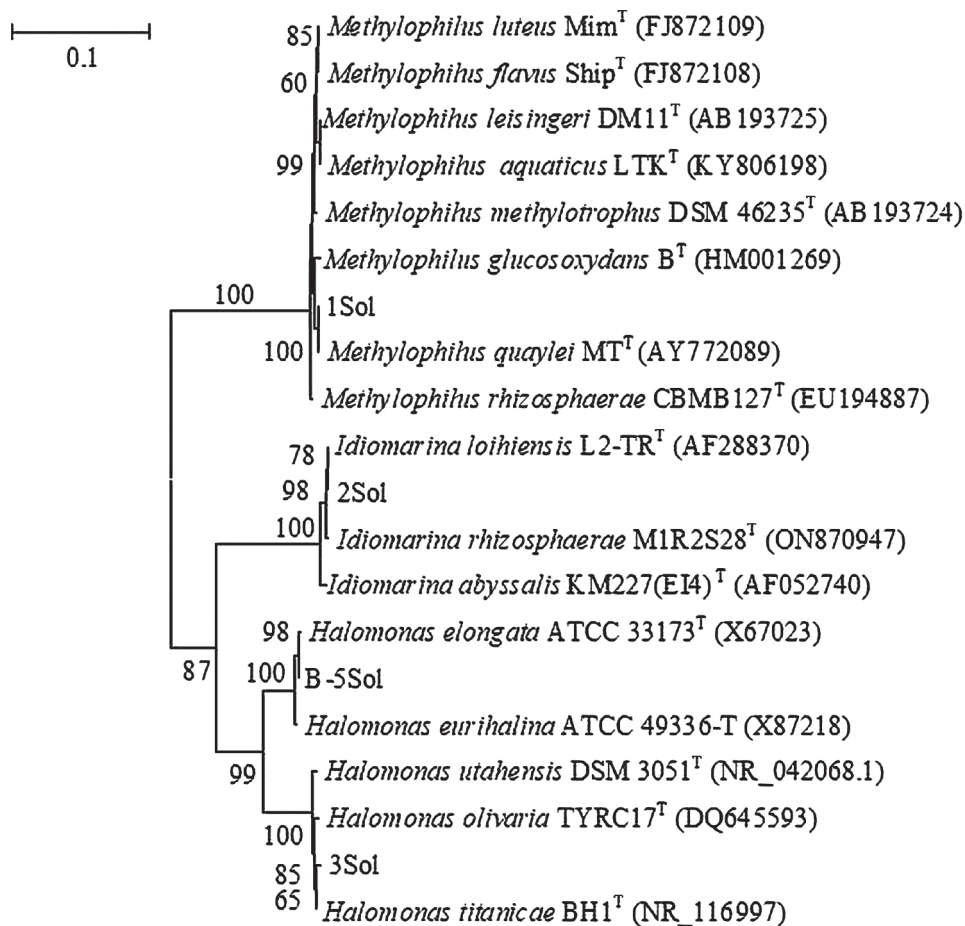


Рис. Филогенетическое положение аэробных метиловых бактерий из Соль-Илецких озер, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Carnimonas nigrificans* ATCC BAA-78 (JAG001000008) в качестве внешней группы

Штамм 2Sol оказался наиболее близок (99.73%) с *Idiomarina loihiensis* L2TR^T. Штамм 3Sol по филогенетическому положению (99.72% сходства) относится к виду *Halomonas titanicae* BH1^T, а штамм B-5 Sol к *Halomonas elongata* DSM 2581^T (99.86% сходства) (рис.). Галофильные штаммы 2Sol, 3Sol и B-5 Sol являются факультативными метилотрофами, т.к. растут на богатых средах (пептон/LB) с 3–6% NaCl (вес/об).

Представители рода *Halomonas* – обитатели водных и почвенных биотопов с высокой соленостью, оптимально растут при 6–10% NaCl в среде с глюкозой в качестве источника углерода и энергии. Ранее установлено, что типовая культура *Halomonas titanicae* BH1^T, выделенная из соскоба с корабля Титаник, не растет на метаноле или формиате, т.е. не является метилотрофом.

Таким образом, впервые выделены представители родов *Idiomarina* и *Halomonas*, способные к метилотрофии. Известно, что *Halomonas elongata* является промышленным продуцентом ценного осмопротектора эктоина при культивировании на среде с глюкозой, L- глутаматом натрия и 12% NaCl. Представляет интерес проведение дальнейших исследований по биосинтезу метилотрофными штаммами 3Sol и B-5 Sol осмопротектора на дешевом непищевом субстрате метаноле.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051).

Литература

1. Agafonova N.V., Kaparullina E.N., Grouzdev D.S., Doronina N.V. *Hanschlegelia quercus* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium isolated from oak buds // *IJSEM*. 2020.70(8), 4646-4652.

Выделение и характеристика двух новых пептидных антибактериальных соединений из культуральных жидкостей штаммов *Streptomyces* sp. 44182 и 37078

Каракчиева А.О.¹, Волынкина И.А.^{1,2}, Никандрова А.А.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

²Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий, Москва
karakchievaa21@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38767

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, пептидные антибактериальные соединения, почвенные бактерии-продуценты

Возникновение и быстрое развитие резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является одной из важнейших проблем современной науки и медицины. Одним из возможных решений может послужить поиск новых антибактериальных соединений, которые, как известно, могут быть выделены из почвенных бактерий-продуцентов [1].

Ранее нами был разработан и оптимизирован метод скрининга, выделения и идентификации потенциально новых антибиотиков в ходе проекта гражданской науки [2]. Данный подход был успешно применен на практике, выявив два штамма актиномицетов, *Streptomyces* sp. 44182 и 37078, продуцирующих биоактивные соединения пептидного строения, не описанные ранее в литературе. Для выделения чистого препарата активного вещества культуральные жидкости были подвергнуты твердофазной экстракции на сорбенте LPS-500-Н, с последующим хроматографическим разделением методом ОФ-ВЭЖХ и проверкой собранных фракций на предмет антибиотической активности с помощью репортерной системы. Поскольку разделение таких биологических смесей часто затруднено из-за большого числа примесей сходной химической природы, для каждого анализируемого вещества условия ВЭЖХ неоднократно уточнялись с целью определения точной локализации активного компонента. Затем активные чистые фракции были проанализированы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) как в режиме положительной, так и отрицательной ионизации с фрагментацией трех наиболее встречаемых ионов.

Таким образом было обнаружено, что два штамма *Streptomyces* sp. 44182 и 37078 продуцируют биологически активные соединения со сходными спектрами фрагментации и точными массами: 2154,736 Да и 2168,763 Да соответственно. Поиск по базам данных химических веществ не дал совпадений по этим соединениям. Разница в массе в 14,027 Да указывает на отличие этих молекул лишь на гомологическую разницу CH₂. Дополнительный масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF однозначно подтвердил пептидную природу новых антибиотиков и позволил выявить их принадлежность к классу лассопептидных антибиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075–15-2021-1085).

Литература

1. De Simeis D., Serra S. A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production Antibiotics // Actinomycetes. 2021. Vol. 10. P. 483.
2. Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A., Udalov A.V., Golovin E.V., Kryakvin M.A., et al. Mechanism-Based Approach to New Antibiotic Producers Screening among Actinomycetes in the Course of the Citizen Science Project // Antibiotics. 2022. Vol. 11. P. 1198.

Сравнение геномов бактериофагов рода *Tequatrovirus* методом генетического штрихкодирования

Кирьянова О.Ю.¹, Чемерис А.В.², Губайдуллин И.М.¹, Киселев С.С.³,
Панюков В.В.⁴, Никулин Н.А.⁵, Зимин А.А.⁵

¹ Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН – обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа

² Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН – обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пущино

⁴ Институт математических проблем биологии РАН – филиал института прикладной математики РАН, Пущино

⁵ ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН

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

Olga.kiryanova27@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38768

Ключевые слова: генетическое штрихкодирование, биоинформатический метод исследования геномов, мультиплексная ПЦР.

Проведено сравнительное исследование родства фагов с помощью метода генетического штрихкодирования на основе проведения виртуальной мультиплексной ПЦР. Данный метод анализа ранее применялся авторами для сравнения геномов растений и пород собак (размеры геномов от нескольких млн. до млрд. п.н.) [1–2], однако он не был апробирован на геномах длиной несколько сотен тыс. п.н. С помощью метода без использования выравнивания, описанного в [3], были исследованы все геномы фагов класса *Caudoviricetes*. Для анализа были взяты 63 генома бактериофагов из рода *Tequatrovirus*, которые были отобраны в базе данных Refseq с помощью ряда критериев, основанных на проверке аннотаций геномов методом пангеномного анализа [4]. В качестве внешних групп были добавлены геномы 2 фагов из рода *Mosigvirus* (RB69, vB_EcoM_JS09) и 2 фагов из рода *Dhakavirus* (JS10, JS98). Всего было использовано 67 геномов.

Для оценки филогенетического родства авторами был использован метод виртуального мультиплексного RAPD-анализа [5] с 4 праймерами GCTGAT, GGACTT, GGTC AA, GTCGTA. Был проведен поиск всех возможных ампликонов для вышеуказанных праймеров при проведении мультиплексной ПЦР в размере от 51 до 500 нуклеотидов. Найденные размеры ампликонов были переведены в бинарный формат, где «1» означает наличие ампликона определенной длины, «0» – отсутствие ампликона определенной длины. На основе полученной бинарной последовательности были построены генетические штрихкоды и составлена матрица попарных расстояний между геномами. Пример результатов анализа для каждого генома представлен в табл. 1.

Таблица 1

Результаты проведения виртуальной мультиплексной ПЦР для *Enterobacteria phage JS10*

Геном	Ампликоны	Бинарная последовательность	Штрих-код
Enterobacteria phage JS10	059 067 09410911611712 012413013215015216918 819619720020320522023 023223323725326526727 128729129529631031431 832833033533833934135 335536136336837037437 637739239540241742242 743543644244745847249 5497500	00000000100000001000000000000000 0000000001000000000000001000000110 010001000001010000000000000000101 0000000000000000001000000000000000 0100000001100100101000000000000001 000000000101100010000000000000010 0000000000101000100000000000000010 0010001100000000000001000100010000 000001010000100110100000000001010 0000101000010100010110000000000000 010010000001000000000000010000100 0010000000110000010000100000000001 00000000000000100000000000000000 000101001	

Литература

1. Кирьянова О.Ю. и др. // Биомика. 2022. Т. 14. № 1. С. 59–67. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-4.
2. Кирьянова О.Ю. и др. // Биомика. 2020. Т. 12. № 2. С. 194–210. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-10.
3. Nikulin N.A. et. al. // Mathematical Biology and Bioinformatics. 2023. V. 18. № 2. P. 323–346. doi: 10.17537/2023.18.323.
4. Nikulin N.A., Zimin A.A. // Front. Microbiol. 2021. V. 6. Article № 632686. doi: 10.3389/fmicb.2021.632686.
5. Кирьянова О.Ю. и др. // Математическая биология и биоинформатика. 2022. Т. 17. № 2. С. 208–229. doi: 10.17537/2022.17.208.

Разнообразие бактериального комплекса почв и сопряженных субстратов заповедников Вьетнама

Князева А.В.^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
aknyazeva1999@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38769

Ключевые слова: тропические почвы, разнообразие прокариот, PGPB, «подвешенная почва», Вьетнам.

Одним из важнейших современных направлений практического применения биологии почв является выделение штаммов микроорганизмов, способных стимулировать рост и развитие важных растений за счет выделения метаболитов – PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria). Наибольшая численность и разнообразие микроорганизмов наземных территорий приурочены к муссонным тропическим лесам. Леса Вьетнама являются значительным пулом микроорганизмов-продуцентов вторичных метаболитов.

Целью работы являлось изучение численности и разнообразия сапротрофного бактериального комплекса почв и сопряженных субстратов (СБК) Вьетнама, а также выявление микроорганизмов, потенциально пригодных для использования в биотехнологии. Объекты исследования включали в себя образцы почв, растительного опада, ризосферной почвы, а также «подвешенной почвы» из корзинок эпифитов, отобранные в заповедниках Тэйзынг и Суанлиен.

Численность сапротрофного бактериального комплекса (СБК) для охраняемого леса Тэйзынг варьировала от 0,03 млн КОЕ/г в образцах гидроморфной темной гумусно-ферраллитной почвы до 5,46 млн КОЕ/г в растительном опаде, отобранным с поверхности этой же почвы. образцах с территории природного заповедника Суанлиен численность СБК была, в среднем, в 5–10 раз выше, чем в образцах почвы и сопряженных субстратов леса Тэйзынг. Полученные данные имеют схожую картину распределения по горизонтам и численно близки и сравнимы с уже исследованными ранее субстратами – почва, опад и «подвешенная почва» заповедников Кон Тю Ранг, Пу Мат, Пу Хоат и др. В целом, наибольшие значения численности СБК были получены для образцов растительного опада и «подвешенной почвы» из корзинок эпифитных папоротников. Доминантами СБК для большинства изученных образцов являлись бактерии родов *Streptomyces* и *Mycrococcus*, субдоминанты и группа среднего обилия включали в себя рода *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и некоторые другие. Также в качестве минорных компонентов были выявлены грамтрицательные бактерии, не идентифицированные до рода. Большинство культивированных на твердых питательных средах бактерий относятся к родам, способным синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов.

На основании проведенных исследований была создана коллекция бактериальных культур. По результатам обработки выделенных штаммов реактивом Сальковского десять из пятидесяти двух культур показали способность к синтезу индолилуксусной кислоты, причем практически все штаммы были выделены из об-

разцов растительного опада с поверхности хорошо увлажненных почв и, в меньшей степени, ризосферной почвы.

Для выявления способности фиксировать атмосферный азот производили посев на среду Эшби и Федорова в модификации Калининской. Для пятнадцати штаммов бактерий была выявлена способность к азотфиксации, семь из них также показали положительную реакцию с реактивом Сальковского. Все азотфиксирующие штаммы были выделены из образцов растительного опада и «подвешенной почвы» из корзинок эпифитных папоротников. Значительная часть микроорганизмов (более 50%) показало высокую ферментативную активность по отношению к часто встречающимся (целлюлоза, лигнин) и реже представленным субстратам (желатин, казеин, крахмал). Также была проверена способность культур к мобилизации фосфатов – одиннадцать штаммов бактерий показали способность к формированию прозрачных «гало» вокруг агаровых блоков на среде Муромцева. Примечательно, что все бактериальные изоляты, обладающие данными способностями, были выделены из образцов растительного опада и «подвешенной почвы», что подтверждает ранее полученные нами данные о повышенной биологической активности данных субстратов.

Растительный материал разной степени разложения является зоной значительного интереса для выделения микроорганизмов ввиду высокого разнообразия и численности СБК. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения коллекционных штаммов с помощью современных микробиологических методов.

Установление генетического потенциала штамма *Dietzia sp. S5*, выделенного из образца антропогенно-загрязненного снега

Копылова О.А.^{1,2}, Французова Е.Э.², Богун А.Г.², Делеган Я.А.²

¹ ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»
ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
oa.kopylova01@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38770

Ключевые слова: *Dietzia*, секвенирование, аннотация генома, биодegradация, устойчивость

Род *Dietzia spp.* представляет собой группу грамм-положительных бактерий, выделяемых из всех сред жизни, в том числе из нефтезагрязненных территорий. Исследуемый штамм *Dietzia sp. S5* был выделен из образца снега, отобранного вдоль автомобильной дороги на территории г. Пушкино, Московской области. Для получения накопительной культуры в качестве источника углерода и энергии был использован нафталин (1 г/л) как представитель фракции ароматических углеводородов нефтепродуктов. ДНК штамма была выделена с помощью фенол-хлороформного метода экстракции, образец секвенирован на платформе MGI (DNBSEQ-G400) с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set (FCL PE150). Сырые прочтения отфильтрованы с помощью ПО Trimmomatic v. 0.39 и собраны с использованием SPAdes v. 3.15.4. В результате обработки получен геном размером 3 823 392 п.н., собранный в 105 контигов.

Сравнительный анализ полного генома *Dietzia sp. S5* с помощью сервиса TYGS показал, что его ближайшим родственником является штамм *Dietzia maris* IMV 195, являющийся типовым для данного вида. При этом параметры DDH (ДНК-ДНК гибридизация) и ANI (анализ нуклеотидной идентичности) для этих штаммов составили 79,1%, и 97,56% соответственно, что позволяет предположительно отнести исследуемый микроорганизм к данному виду.

Проведена функциональная аннотация штамма. Из 3632 белок-кодирующих последовательностей с помощью сервисов RAST, PROKKA и GhostKOALA было проаннотировано и отнесено к различным категориям 1675 (46,9%). Среди выделенных субсистем к категории «Биодegradация и метаболизм ксенобиотиков» от-

несено 84 гена, среди которых 48 генов путей биоконверсии ароматических углеводов (в т.ч. бензоатов, катехола, фенола и др.), ген алканмонооксигеназы *alkB* и гены цитохрома P450 (CYP 153), отвечающие за разложение линейных углеводов нефти и нефтепродуктов.

Штамм несет гены, обеспечивающие комбинацию различных механизмов устойчивости к ряду тяжелых металлов, таких как кадмий, цинк, кобальт, свинец, ртуть и медь. Также на генном уровне присутствует устойчивость к бета-лактамам антибиотикам благодаря гену металло-зависимой гидролазы из суперсемейства бета-лактамаз и к фторхинолону, производному налидиксовой кислоты.

С помощью сервиса AntiSMASH идентифицированы кластеры биосинтеза вторичных метаболитов, такие как кластеры синтеза каротиноидов (100%), осмопротектора эктоина (75%), вещества с антибактериальной активностью ϵ -Поли-L-лизина (100%) и NI-сидерофора десферриоксамина В (40%).

Таким образом, выполнена оценка метаболического потенциала штамма *Dietzia* sp. S5. Обнаружены генетические системы деградации ароматических и алифатических соединений, проведена экспериментальная оценка способности к росту на различных углеводородах, являющихся компонентами нефти и нефтепродуктов.

Элиминация донорной культуры *Escherichia coli* S17-1 после конъюгативного переноса плазмидной ДНК в *Rhodobacter capsulatus* B10

Майорова Е.В., Петушкова Е.П., Цыганков А.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН)
ekaterina.majorova.97@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38771

Ключевые слова: конъюгация, пурпурные бактерии, *Rhodobacter capsulatus*, ингибирование роста культуры-донора, подавление роста *E. coli*, теллурид калия.

Конъюгация, как наиболее часто используемый метод передачи целевой генетической информации у пурпурных бактерий (Blankenship et al., 2004), обладает рядом преимуществ и недостатков над другими методами мутагенеза. Наиболее существенным минусом является активно растущая культура-донор (в качестве которой часто используется *E. coli*) при селективном отборе конъюгантов. Данная проблема крайне актуальна при конъюгативном переносе плазмид посредством бесшовного мутагенеза с применением контрселекции клонов, не получивших плазмидной ДНК с суицидальным геном от родительской клетки (Ryu et al., 2014). Это связано с тем, что возникает сложность обнаружения небольшого числа рекомбинантов среди вторичного роста реципиентной культуры, сохранившей жизнеспособность благодаря донору, разрушающему селективный антибиотик. Подавления роста *E. coli* иногда добиваются за счет использования сред с недостатком питательных субстратов (Koch et al., 1998), по которым бактерия является ауксотрофом, или бактериофага T4D (Ryu et al., 2014).

Цель данной работы заключалась в подборе способа элиминации *E. coli* S17-1, использующейся в качестве донора при конъюгации с *Rba. capsulatus* B10.

В связи с этим культуры *E. coli* S17-1 и *Rba. capsulatus* B10 в экспоненциальной фазе роста по отдельности и в смеси высевали шпателем на агаризованную среду Ормерада с единственным субстратом (малатом, лактатом или ацетатом) и выращивали аэробно в темноте и анаэробно на свету в течение 6–7 дней. Контролем служил посев культур на богатую среду YPS. В результате при высеве как монокультур *E. coli*, так и в смеси с *Rba. capsulatus* на минеральных средах наблюдалось отсутствие роста или единичные колонии кишечной палочки, в то время, как на контрольных чашках с YPS культура демонстрировала сплошной рост

газоном. В случае высева смеси культур *E. coli* и *Rba. capsulatus* на минеральные среды с единственным источником углерода выявлен рост только пурпурных колониобразующих единиц (КОЕ), характерных для *Rba. capsulatus*. В некоторых случаях присутствовали единичные белые колонии *E. coli*. Поскольку известно, что визуально однородные колонии могут быть бинарны, был осуществлен высев выборки пурпурных КОЕ с чашек со смесью *E. coli* и *Rba. capsulatus* на YPS методом истончающего штриха. В результате во всей выборке наблюдался рост обеих культур. По всей видимости, не смотря на неспособность расти в монокультуре на обедненной среде, *E. coli* все же выживает при росте в смеси с *Rba. capsulatus* либо за счет метаболитов, выделяемых пурпурной бактерией в окружающую среду, либо получает их через межклеточные взаимодействия. Таким образом продемонстрировано, что данный способ не пригоден для подавления культуры-донора при работе с *Rba. capsulatus*.

Еще одним фактором ингибирования *E. coli* является токсическое действие теллурита калия (K_2TeO_3), подавляющего рост кишечной палочки при использовании в небольших концентрациях, которые в то же время не оказывают существенного влияния на рост пурпурных бактерий (Moore and Kaplan, 1992; Borghese et al., 2004). При выращивании на теллурите калия клетки становятся черными за счет накопления элементарного теллурита в цитоплазматической мембране (Borghese et al., 2004). Однако при следующем пассаже на среду без K_2TeO_3 культура приобретает естественный цвет. В эксперименте по изучению воздействия K_2TeO_3 на *E. coli* и *Rba. capsulatus* для высева использовались культуры в экспоненциальной фазе роста. Посев осуществлялся с помощью шпателя на агаризованные среды YPS и Ормерода с 20 мМ малата, содержащие различные концентрации K_2TeO_3 . Культивирование проводили аэробно в темноте и анаэробно на свету. По истечении 4-7 дней *E. coli* в монокультуре демонстрировала полное отсутствие роста на среде с концентрацией теллурита калия 50 мкг/мл как в аэробных, так и в анаэробных условиях. При этом на среде YPS аэробно выращенная культура *Rba. capsulatus* выдерживала 100 мкг/мл K_2TeO_3 . Однако в анаэробных условиях рост пурпурной бактерии на YPS с теллуритом калия отсутствовал при всех анализируемых концентрациях. Напротив, на среде Ормерода с малатом при анаэробном фототрофном культивировании обнаружены колонии на среде с K_2TeO_3 в концентрации 100 мкг/мл даже при разведении культуры в 10^5 и 10^6 раз. А в аэробных темновых условиях на 50 мкг/мл теллурита калия рост тонкого слоя клеток наблюдался только у неразбавленной культуры. При 200 мкг/мл K_2TeO_3 колоний не обнаружено ни при каких условиях культивирования. КОЕ, выросшие после совместного культивирования *Rba. capsulatus* и *E. coli*, были проверены на бинарность высевом на богатую среду истончающим штрихом. В результате на всех чашках наблюдался рост монокультуры *Rba. capsulatus*. Таким образом, был подобран метод элиминации *E. coli*, который может быть использован после осуществления конъюгативного переноса плазмидной ДНК для отбора рекомбинантных клонов *Rba. capsulatus*.

В работе также рассматривается возможность удаления культуры *E. coli* из конъюгативной смеси ее кратковременной инкубацией в жидкой среде с K_2TeO_3 перед высевом на среду с селективным антибиотиком. Ожидается, что применение данного подхода повысит выживаемость целевых клонов *Rba. capsulatus* разделением во времени воздействия на культуру теллурита калия и антибиотика, а также уменьшением продолжительности контакта с K_2TeO_3 .

Работа выполнена в рамках ГЗ№ 122041200039-0.

Литература

1. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic photosynthetic bacteria // Kluwer academic publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2004. P. 1283.
2. Borghese R., Borsetti F., Foladori P., Ziglio G., Zannoni D. Effects of the Metalloid Oxyanion Tellurite (TeO_3^{2-}) on Growth Characteristics of the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* // Applied and Environmental Microbiology. 2004. V. 70. № 11. P. 6595–6602.
3. Koch H.-G., Myllykallio H., Daldal F. [6] Using Genetics to Explore Cytochrome Function and Structure in *Rhodobacter* // Photosynthesis: Molecular Biology of Energy Capture. 1998. P. 81–94.
4. Moore M.D., Kaplan S. Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class *Proteobacteria*: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides* // Journal of Bacteriology. 1992. V. 174, № 5. P. 1505–1514.
5. Ryu M.-H., Hull N.C., Gomelsky M. Metabolic engineering of *Rhodobacter sphaeroides* for improved hydrogen production // International Journal of Hydrogen Energy. 2014. V. 39, № 12. P. 6384–6390.

Штаммы базидиальных грибов – продуценты молокосвертывающей активности

Майорова И.В.¹, Сайнчук А.Д.², Псурцева Н.В.¹

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

² ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
st076107@student.spbu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38772

Ключевые слова: чистые культуры, макромицеты, сычужная активность, протеолитические ферменты, целлюлолитические ферменты

В настоящее время на рынке представлен широкий ассортимент различных молокосвертывающих ферментных препаратов, возникший вследствие кратного увеличения мирового производства сыров с середины прошлого века. Это обусловило необходимость поиска альтернативных источников сычужных ферментов, в числе которых различные чистые культуры базидиомицетов, имеющие большой потенциал в производстве альтернативных коагулянтов молока. В отличие от широко используемых в сыроварении культур микромицетов, высшие базидиальные грибы не имеют стадии спороношения в культуре, что позволяет повысить безопасность сотрудников на производстве, а также в их препаратах отсутствует горечь, характерная для микромицетов. Поэтому в мире были развернуты работы по поиску и изучению специфических протеиназ молокосвертывающего действия у макромицетов. Скрининг штаммов дереворазрушающих, подстилочных и микоризных грибов из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE-BIN) показал, что высокой активностью обладали штаммы-кислотрофы – *Flammulina velutipes*, *Panellus stipticus*, *Panus tigrinus*, *Funalia trogii* и ряд других. Однако, самую высокую молокосвертывающую активность показывал штамм эктомикоризного гриба *Russula decolorans* LE-BIN 0456 (сыроежка сереющая). Ферментный экзопрепарат на основе *R. decolorans* обладал наибольшими достоинствами, он был назван руссулином и предложен для практического получения и использования в производстве сыра [1, 2]. На эти разработки было получено несколько авторских свидетельств СССР (№ 522230, 1972; № 460880, 1975; № 595889, 1975; № 753895, 1980; № 806760, 1980) и патент Франции (№ 7517775, 1977). Позднее был выявлен еще один высокопродуктивный штамм – *Mycena pura* LE-BIN 0426 (А.с. СССР № 1374778, 1987). Однако в годы перестройки биотехнологическое производство в стране пришло в упадок, и эти исследования были остановлены. Следует отметить, что аутентичность штамма *R. decolorans* долгие годы вызывала сомнение. Цитологические исследования послужили подтверждением принадлежности штамма лишь к базидиальным грибам. Верификация молекулярными методами в те годы не дала результатов. Позднее выяснилось, что выделение в культуру *Mycena pura* также является проблематичным. Со временем, активность штаммов в результате хранения в коллекции методом регулярных пересевов была потеряна, а в дальнейшем утрачены и сами штаммы. Однако оба штамма *R. decolorans*, как объект патентования, был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), и хранился там 30 лет методом криоконсервации в жидком азоте при -196 °С. По истечении этого срока реплики штаммов были переданы назад в родную коллекцию LE-BIN. Появилась возможность для возобновления исследования этих штаммов.

В настоящей работе проведена идентификация штаммов методом ПЦР-анализа, изучены некоторые биохимические, морфологические, физиологические характеристики этих штаммов после длительного криохранения, осуществлено их сравнение между собой и выявлены отличия в ростовой и ферментативной активностях. При секвенировании ITS участка ярдНК у исследованных штаммов с использованием стандартных методов была установлена принадлежность обоих штаммов к роду *Gymnopilus*.

Линейную скорость роста определяли при выращивании штаммов в чашках Петри 90 мм на стандартных коммерческих агаризованных средах MEA (1.5% мальц-экстракт, 2% агар Difco) и PDA (картофеле-декстрозный агар, 1.9%, Applichem PanReas с добавлением агара 0.75%, Difco) при 25 °С в темноте. Резуль-

таты продемонстрировали немного более высокую скорость линейного роста у штамма LE_BIN 0426, чем у LE-BIN 0456, при этом более высокие значения приходились на среду MEA (2.3 ± 0.1 мм/сут у LE-BIN 0426 и 1.9 ± 0.1 мм/сут у LE-BIN 0456), чем на PDA (1.9 ± 0.1 мм/сут и 1.7 ± 0.2 мм/сут. соответственно).

Макроморфология колоний обоих штаммов характеризовалась сходными признаками: внешняя линия ровная, край прижатый и погруженный с образованием просвечивающей краевой зоны, структура воздушного мицелия шерстистая с белыми переплетающимися гифами. Реверзум штамма LE-BIN 0426 неизменный, а у LE-BIN 0456 – слегка темнеющий. По микроморфологическим признакам штаммы также не отличались между собой, образуя длинные ветвящиеся гифы без пружек, с гифальными кольцами, многочисленными артроконидиями и периодически встречающимися терминальными хламидоспорами.

Протеолитическую активность определяли в чашках Петри 90 мм за счет оценки величины гидролиза желатиновой пленки (4 г пищевого желатина на 100 мл дистиллированной воды) в течение 48 часов инкубации в темноте при 25 °С. В результате было продемонстрировано отсутствие желатиназной активности у шт. LE-BIN 0426, тогда как у LE-BIN 0456 зона лизиса составила 17.5 ± 0.3 мм.

Целлюлолитическую активность определяли в чашках Петри 90 мм по величине зоны гидролиза 1% агаризованной микрокристаллической целлюлозы в течение 48 часов при 25 °С. Зоны проявлялись при помощи 0.5% раствора I_2 в 2% KI. При этом была отмечена более высокая активность штамма LE-BIN 0456 (22.4 ± 0.4 мм), чем LE-BIN 0426 (16.0 ± 1.9 мм).

Окислительную активность определяли экспресс-методом по интенсивности окисления сиригальдазина и гваякола через 5 минут, 1 час и 3 часа. Штамм LE-BIN 0456 не проявил заметной окислительной активности, тогда как инокулом LE-BIN 0426 проявил интенсивную окраску при реакции с сиригальдазином уже через 1 час инкубации и небольшую окрашенность при взаимодействии с гваяколом через 3 час.

Для определения молокосвертывающей активности (МСА) культурального фильтрата представленные штаммы выращивали глубинным способом в жидкой питательной среде (сусло, 2%), при 25 °С, pH 6,0 до стерилизации. Определение МСА проводили на 3, 5, 7, 10, 12 и 15 дни культивирования по методу Kawai и Mukai [3]. За единицу МСА принимали такое количество фермента, которое створаживает 100 мл молока за 40 минут при 35 °С. В результате, у штамма LE-BIN 0426 сычужная активность не была выявлена в данных условиях культивирования, тогда как у штамма LE-BIN 0456 активность проявлялась, начиная лишь с 7 дня культивирования. Значения МСА постепенно увеличивались, составляя 14.8 Е/мл на 7 сутки роста и до 20 Е/мл на 15-й день.

Таким образом, удалось установить принадлежность к роду *Gymnopilus* штаммов базидиомицетов, являвшихся активными продуцентами молокосвертывающих ферментов, выявить их культурально-морфологические характеристики и биосинтетическую активность после 30 лет хранения в коллекции методом криоконсервации. Исследованные штаммы демонстрировали отличия в пределах штаммовой вариабельности. МСА была отмечена при культивировании только одного штамма LE-BIN 0456, что, вероятно, свидетельствует о необходимости подбора условий культивирования для оптимизации биосинтеза карбоксильной протеиназы.

Литература

1. Федорова Л.Н., Дроздова Т.Н., Гаврилова В.П. Биосинтез молокосвертывающего фермента базидиальным грибом *Russula decolorans* шт. 0456. // Микол. и фитопатол. 1981. Т. 15, N 6. С. 496–500.
2. Руденская Г.Н., Гайда А.В., Степанов В.М. Карбоксильная протеиназа из базидиального гриба *Russula decolorans* Фр. шт. 0456 // Биохимия. 1980. Т. 45, N3. С. 561–568.
3. Kawai M. Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes. I. Screening test of Basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes / M. Kawai, N. Mukai // Agric. Biol. Chem. 1970. V. 34(2). P. 159–163.

Актуальные концепции работы коллекции культур микроводорослей

Мальцев Е.И., Куликовский М.С., Кезля Е.М., Мальцева С.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
maltsev.ye@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38773

Ключевые слова: водоросли, коллекция культур, разнообразие, филогения, цианобактерии

В исследованиях по скринингу биотехнологического потенциала микроводорослей используют виды и штаммы различных таксономических групп, выделенные из разнотипных экосистем и регионов. Микроводоросли присутствуют в самых разнообразных экосистемах и широко распространены в пресноводных и соленых водоемах, в почвах с различным водным, питательным, минеральным режимом, в аэрофитных условиях на различных поверхностях, представляют различные экологические группы и характеризуются широким спектром адаптаций. Это создает существенные отличия в их способности синтезировать определенные метаболиты, особенно те, что связаны с обеспечением защиты организмов от окислительного стресса, который развивается в ответ на действие неблагоприятных факторов среды и может привести к гибели клетки. Потому большая часть исследований посвящена оценке состава и количества метаболитов новых штаммов и видов микроводорослей из различных экосистем, в том числе с экстремальными условиями обитания (Maltsev et al. 2017). Актуальным остается и скрининг биотехнологического потенциала штаммов различных мировых и персональных коллекций микроводорослей. Жизнеспособность таких штаммов и биологические свойства поддерживается за счет специализированных сред и условий культивирования. Некоторые штаммы в коллекциях культивируются десятки лет и востребованы в настоящее время для исследований по различным направлениям, включая биотехнологические.

На сегодняшний день для крупных центров альгологических исследований создание и поддержание культур водорослей и цианобактерий является распространенной практикой. Среди наиболее крупных коллекций с широкой таксономической и экологической представленностью разных групп водорослей следует выделить Коллекцию культур водорослей Геттингенского университета SAG, в которой депонировано более 2300 штаммов, Коллекцию культур водорослей Техасского университета в Остине (UTEX) – более 3000 штаммов, Коллекцию культур автотрофных организмов (CCALA) Института ботаники Чешской АН – более 720 штаммов. На территории России поддерживается несколько коллекций культур водорослей:

– Коллекция водорослей и цианобактерий лаборатории Молекулярной систематики водных растений ИФР РАН – более 3000 штаммов водорослей и цианобактерий. Основу фонда составляют диатомовые и зеленые водоросли, а также цианобактерии; в меньшем количестве представлены эустигматофитовые, желтозеленые и золотистые водоросли.

– Альгологическая коллекция ИФХиБПП РАН (ACSSI) – около 300 штаммов зеленых, охрофитовых водорослей и цианобактерий.

– Коллекция микроводорослей ИФР РАН (IPPAS) – более 300 штаммов зеленых, золотистых, красных водорослей и цианобактерий.

– Коллекция культур водорослей при Гербарии СИФИБР СО РАН (IRK-A) – 165 штаммов в основном зеленых водорослей и цианобактерий.

– Коллекция водорослей и цианобактерий Башкортостана (BCAC) – более 1200 штаммов эукариотических водорослей и цианобактерий.

– Коллекция цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Санкт-Петербургского государственного университета (CALU) – более 1000 штаммов водорослей и цианобактерий.

– Коллекция живых культур водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (SYKOA) – более 250 штаммов преимущественно зеленых водорослей и цианобактерий.

– Коллекция живых культур планктонных микроводорослей при ФИЦ ИнБЮМ – более 60 видов морских водорослей.

– Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей при ФИЦ ИнБЮМ – более 40 штаммов пресноводных планктонных, почвенных и аэрофитных хлорофициевых водорослей.

Не смотря на разнообразие коллекций культур и достаточно большую представленность штаммов водорослей в них, следует учитывать, что отдельные коллекции фокусируются на разных группах водорослей или их условиях обитания. Так, например, в SAG представлены микроскопические водоросли из наземных местообитаний и, в связи с этим в ней мало депонировано представителей Naptophyta (13 штаммов), Dinophyta (14), Phaerophyceae (12), а также Bacillariophyceae (18), которые являются одной из самых многовидовых групп водорослей. В коллекции SCALA поддерживается всего 4 штамма диатомовых водорослей. Большое количество диатомей депонировано в коллекции UTEX – 486 шт., однако это не более 17% от общего числа штаммов. При этом исследования, направленные на поиск потенциальных биотехнологически ценных штаммов водорослей, а также анализ их способности аккумулировать достаточное количество ценных метаболитов и возможности давать экономически выгодные объемы биомассы среди российских коллекций культур водорослей выполняются лишь несколькими научными коллективами, чего недостаточно для конкуренции на мировом уровне. В связи с этим при поддержании коллекции микроводорослей необходимо учитывать филогенетический, экологический, географический и мультимиксный аспекты. Именно это позволит использовать всю многомерную природу механизмов регуляции метаболома микроводорослей в контексте поиска ценных штаммов, оценки их потенциальных возможностей к продуцированию целевых соединений и прогнозирования неблагоприятных сценариев ограничения продуктивности во время культивирования с использованием абиотических стрессоров.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-74-10081).

Литература

1. Maltsev Y.I., Konovalenko T.V., Barantsova I.A., Maltseva I.A., Maltseva K.I. Prospects of using algae in biofuel production // Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2017. 8(3). P. 455–460. DOI: 10.15421/021770.

Молекулярный профиль фосфатидилхолинов ксилотрофных базидиомицетов в условиях межвидового антагонизма

Манжиева Б.С.¹, Сеник С.В.¹, Мишарев А.Д.², Серебряков Е.Б.², Котлова Е.Р.¹

¹ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

²Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» СПбГУ, Санкт-Петербург
bmanzhieva@binran.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38774

Ключевые слова: фосфолипиды, липидомика, базидиомицеты

Различные грибы, растущие на одном и том же субстрате, могут взаимодействовать на расстоянии, обмениваясь химическими сигналами, что приводит к взаимному или избирательному ингибированию роста без прямого контакта гиф. (Heilmann-Clausen and Boddy, 2005). Напротив, некоторые виды реагируют или проявляют признаки реакции на сопротивление только после прямого контакта с мицелием. Чтобы уменьшить активность агрессивного конкурента, большинство видов образуют плотный слой воздушного мицелия на границе взаимодействия (Rayner et al., 1994; Boddy, 2000).

Обнаружено, что морфология взаимодействующего мицелия ксилотрофных базидиомицетов может различаться на разных участках, что означает возможность включения антагонистических механизмов в ответ на локальные стимулы (Rayner et al., 1994). Конкурентные взаимодействия грибов опосредованы разнообразными антагонистическими механизмами, которые могут действовать агрессивно или оборонительно и приводят к

полному или частичному вытеснению одного из взаимодействующих видов, либо к достижению паритета (Boddy, 2000; Boddy, Hiscox, 2016).

Целью данного исследования стало определение роли фосфолипидов в межвидовом взаимодействии грибов. Модельными объектами выбраны культуры базидиальных грибов, контрастные по скорости роста и фосфолипидному профилю – *Flammulina velutipes* LE-BIN 1483, *Sparassis crispa* LE-BIN 2902, *Irpex lacteus* LE-BIN 4341, *Junghuhnia nitida* LE-BIN 2013 и *Psathyrella sp.* LE-BIN 2570, полученные из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова. Штаммы выращивали при температуре 25 °С в виде поверхностной культуры на сусло-агаре, *F. velutipes* и *J. nitida* – в течение 7 дней, *F. velutipes* и *I. lacteus* – в течение 5 дней, *F. velutipes* и *Psathyrella sp.* – в течение 6 дней, *F. velutipes* и *S. crispa* – в течение 30 дней по отдельности (контроль) и попарно.

Экстракцию липидов проводили изопропанолом и изопропанолом-хлороформом (1:1) согласно Nickols et al. (1969). Для каждой повторности объединяли мицелий 10 колоний. После этого выделяли из липидного экстракта отдельные классы фосфолипидов с помощью двумерной ТСХ по Bening et al. (1995).

Структурное разнообразие молекулярных видов фосфолипидов определяли с помощью LC-MS/MS анализа методом MRM на масс-спектрометре с тройным квадруполем Shimadzu LCMS-8030.

По данным LC-MS/MS, в составе мембранных липидов *F. velutipes* основным фосфолипидом является фосфатидилхолин (ФХ), представленный молекулярными видами, этерифицированными С14–С24 жирными кислотами с 1–3 двойными связями, из которых 70–80% составляет один молекулярный вид – 18:2/18:2 ФХ.

При совместном культивировании *F. velutipes* с *S. crispa* наблюдалось угнетение роста *F. velutipes*, при этом мицелий стал более плотным, с бахромчатым краем. Эти изменения в скорости роста и морфологии *F. velutipes* коррелировали с увеличением соотношения двух основных классов липидов ФХ и ФЭ (фосфатидилэтаноламина) и уменьшением количества фосфатидной кислоты (ФК). Кроме того, в профиле молекулярных видов фосфолипидов увеличивалась доля полиненасыщенных молекулярных видов 18:2/18:2 и 18:2/18:3. Реал-тайм ПЦР анализ генов биосинтеза фосфолипидов продемонстрировал усиление экспрессии генов пути метилирования ФЭ и понижение уровня экспрессии генов пути Кеннеди.

Чтобы проверить, являются ли описанные изменения в липидоме *F. velutipes* в ответ на культивирование с *S. crispa* универсальными для всех типов антагонистических взаимодействий с другими видами грибов, были проведены эксперименты по совместному культивированию *F. velutipes* со штаммами грибов, имеющими разный антагонистический потенциал – *I. lacteus*, *J. nitida* и *Psathyrella sp.*

Рост и морфология *F. velutipes* в присутствии *I. lacteus* значительно не изменялись, тем не менее, в составе фосфолипидов *F. velutipes* отмечено увеличение доли 18:2/18:2 и 18:2/18:3 молекулярных видов. При совместном культивировании *F. velutipes* с *J. nitida* было отмечено образование мицелиального заграждения для предотвращения обрастания мицелием вида-антагониста, а также наблюдалось увеличение доли молекулярных видов 18:2/18:3 и 18:3/18:3 ФХ и уменьшение доли 16:0/18:1 ФХ. При культивировании *F. velutipes* совместно с сильным антагонистом *Psathyrella sp.* отмечено торможение ростовой активности *F. velutipes* и увеличение 18:2/18:2 ФХ и 18:2/18:3 ФХ.

Таким образом, при совместном культивировании *F. velutipes* с разными видами грибов, обладающими слабым и сильным антагонистическим потенциалом, происходят накопление полиненасыщенных молекулярных видов фосфолипидов, содержащих линоленовую кислоту. Необходимы дальнейшие исследования для выявления функций полиненасыщенных молекулярных видов в процессах антагонистических взаимоотношений.

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

Антагонистическая активность стрептомицетов из ризосферы лекарственных растений

Мокрушина С.Э.¹, Широких И.Г.²

¹ Вятский государственный университет
sveta.flouni@gmail.com

² Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого
irgenal@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38775

Ключевые слова: ризосфера, стрептомицеты, антагонизм.

В настоящее время ведется поиск новых микроорганизмов, стимулирующих рост растений (PGPR). Среди них перспективными являются штаммы, выделенные из ризосферной почвы растений [1], так как наибольший вклад в улучшение роста растений вносят именно бактерии, живущие в пространстве около корней. Лекарственные растения обладают богатым метаболическим потенциалом, являясь продуцентами множества различных биологически активных веществ [2]. Исследования ризосфер лекарственных растений показывают, что благодаря их свойствам данные экологические ниши являются особенно привлекательными для микроорганизмов [3]. Актиномицеты являются перспективной группой бактерий для изучения ростстимулирующих свойств. Благодаря способности легко адаптироваться к среде обитания они в большом количестве встречаются в почве. Большинство вторичных метаболитов, синтезируемых актиномицетами, обладают антибиотическими свойствами, что определяет их свойство подавлять рост фитопатогенов [4].

Цель работы – изучение антагонистической активности стрептомицетов из ризосферы двух лекарственных растений.

Объектами исследования являлись 13 штаммов актиномицетов из ризосферы крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и 12 штаммов из ризосферы пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris* L.).

В качестве тест-культур для определения антагонистической активности были использованы фитопатогенные грибы *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* Я19/з.

Выбранные тест-культуры патогенов засеивали сплошным газоном на солодовый агар. Посевы культивировали при 28 °С в течение 10 суток. Штаммы стрептомицетов выращивали в жидкой питательной среде Гаузе 1 на качалке (120 об./мин) в течение 7 суток. Блочки с мицелием микромицетов вырезали стерильным сверлом и помещали в центр чашки Петри с солодовым агаром. Вокруг блоков располагали диски из фильтровальной бумаги, на которые наносили жидкие культуры актиномицетов (10 мкл). Посевы культивировали в течение 14 суток.

Антагонистическую активность штаммов стрептомицетов определяли по диаметру зон задержки роста тест-культур. Штаммы, в зависимости от величины зоны подавления роста тест-культур, были разделены на группы со слабой активностью – зона не более 10 мм, умеренной – зона от 11 до 20 мм и сильной антагонистической активностью – зона более 21 мм.

Среди 13 штаммов актиномицетов, полученных из ризосферы крапивы двудомной, 6 проявили умеренную активность к одной или двум тест культурам (табл.). Ни один из штаммов не проявил высокой антагонистической активности.

Из 12 ризосферных штаммов пастушьей сумки 5 изолятов проявили умеренную или слабую активность к одной тест-культуре. Один из 12 ризосферных изолятов пастушьей сумки (ПС-8) проявил антагонизм ко всем тест-культурам фитопатогенных грибов.

Таким образом, из всех изученных штаммов стрептомицетов наиболее перспективным является штамм ПС-8, полученный из ризосферы пастушьей сумки. Данный штамм будет использован для дальнейших исследований его свойств в качестве кандидатного штамма для создания биопрепаратов, направленных на защиту растений от фитопатогенов.

Диаметр зон подавления роста тест-культур фитопатогенных грибов штаммами актиномицетов

Штаммы актиномицетов	Микромицеты-фитопагены			Суммарная активность
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Alternaria Я19/з</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	
	Диаметр зоны подавления роста, мм			
КР-1	0	0	0	0
КР-2	0	0	0	0
КР-3	0	0	0	0
КР-4	0	13	0	13
КР-5	11	0	0	11
КР-6	13	0	0	13
КР-7	14	11	0	25
КР-8	0	0	0	0
КР-9	12	13	0	25
КР-10	0	0	0	0
КР-11	0	0	0	0
КР-12	10	0	0	10
КР-13	0	13	0	13
ПС-1	12	0	0	12
ПС-2	0	0	0	0
ПС-3	0	0	15	15
ПС-4	0	0	9	9
ПС-5	0	0	0	0
ПС-6	0	0	0	0
ПС-7	0	0	15	15
ПС-8	13	6	11	30
ПС-9	12	0	8	20
ПС-10	13	0	6	19
ПС-11	11	0	6	17
ПС-12	0	0	9	9

Литература

1. Кожемяков А.П., Тимофеева С.В., Попова Т.А. Разработка и перспективы использования биопрепаратов комплексного действия // Защита и карантин растений. 2008. №. 2. С. 42–43.
2. Асякина Л.К. Разработка технологии извлечения комплекса биологически активных веществ из корневых культур *in vitro* лекарственных растений // Л.Н. Асякина, Н.В. Фотина, А.А. Степанова [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. 2021. №. 3. С. 95–104.
3. Жаркова Е.К. Влияние лекарственных растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) на микробные сообщества почвы / Е.К. Жаркова, А.Д. Железова, А.А. Ванькова. // Доклады ТСХА: Сборник статей. Выпуск 292. Часть II. – М.: РГАУ–МСХА, 2020. С. 370–373.
4. Бойкова И.В. Вторичные метаболиты актиномицетов – основа для создания новых инсектицидных биопрепаратов // Вестник защиты растений. 2016. Т. 89. № 3. С. 30–32.

Большой С-концевой фрагмент (Met225- Ile412) гемолизина II *Bacillus cereus* обеспечивает агрегацию эритроцитов

Нагель А.С.¹, Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Лучкина П.Н., Сиунов А.В.¹,
Каратовская А.П.², Замятина А.В.², Руденко Н.В.², Солонин А.С.¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»

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

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

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38776

Ключевые слова: токсин, укороченные пептиды, моноклональные антитела, биоинформатика

Bacillus cereus – условно-патогенная грамположительная анаэробная спорообразующая бактерия, обитающая в различных условиях окружающей среды. Одним из факторов патогенности является гемолитический токсин II, который относится к группе β-складчатых порообразующих токсинов. HlyII *B. cereus* отличается от других порообразующих наличием С-концевого удлинения из 94 аминокислотных остатков HlyIICTD [1, 2]. С использованием моноклональных антител (МА) против HlyIICTD в очищенных с помощью аффинной хроматографии препаратах HlyII обнаружено несколько усеченных с N-конца белковых продуктов, открытые рамки считывания которых совпадают с рамкой *hlyII*. Среди выявленных укороченных форм обнаружен продукт из 188 аминокислот массой 21,3 кДа [1]. Этот продукт, названный HlyIIICTD, может существовать как у *B. cereus* – лизогенного штамма *B. thuringiensis* [3], так и у *B. anthracis*. Анализ репрезентативности гена *hlyII* среди геномов *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. thuringiensis* с помощью сервиса PATRIC Comparative Systems выявил отдельные укороченные формы этого гена. Биоинформатический анализ показал, что все гены гемолизина II с нарушенной рамкой считывания и неспособные синтезировать полноразмерный токсин содержат кодирующую последовательность, частично или полностью включающую *hlyIIICtd*. Сохранение укороченной открытой рамки считывания *hlyII* позволяет предположить функциональную значимость HlyIIICTD как независимого белкового продукта. С целью изучения механизмов порообразования, а также поиска путей подавления гемолиза HlyII в данной работе получена панель МА против HlyIIICTD, освобожденная от моноклональных антител против HlyIICTD. Сконструировано несколько *E. coli* штаммов – продуцентов этого полипептида. В качестве антигена для иммунизации был использован HlyIIICTD14579, клонированный в плазмидный вектор pTSL. Сконструирована плазида pTSLHlyIIICTD14579, в которой белок HlyIIICTD14579 «слит» с шапероном SlyD, а сам SlyD и шестигистиридиновый тег отделены от HlyIIICTD сайтом разрезания TEV-протеазы. Индукция экспрессии синтеза белка в полученном штамме-продуценте *E. coli*, содержащего pTSLHlyIIICTD14579, позволила получить HlyIIICTD14579, «слитый» с шапероном SlyD, в растворимой форме. Для разделения целевого белка и шаперона использовали обработку белка TEV-протеазой с последующей ионообменной хроматографией. Таким образом, впервые получен очищенный белок HlyIIICTD14579 в растворимой форме. Показано взаимодействие нативного белка HlyIIICTD14579 с эритроцитами кролика *in vitro* и обнаружена активность, приводящая к агрегации эритроцитов. Среди отобранных МА обнаружены антитела, способные подавлять гемолитическую активность HlyII. Показано, что HlyIIICTD способен агрегировать эритроциты кролика [4]. Агрегация была обратимой, не приводила к лизису эритроцитов, эритроциты сохраняли свою целостность, что подтверждалось отсутствием изменений в адсорбции супернатанта эритроцитов при длине волны 541 нм до и после реакции агрегации. С-концевой избыток HlyII в 94 аминокислоты не вызывал агрегации, что указывает на участие (в агрегации) участка гемолизина II, расположенного между С-концевым доменом и основной частью токсина [1]. Добавление в реакционную смесь МА против HlyIIICTD приводило к подавлению агрегации эритроцитов кролика при 40-кратном молярном избытке. Часть полученных и очищенных МА ингибировала агрегацию эритроцитов кролика. Кроме того все МА подавляли гемолиз эритроцитов в разной степени. Агрегация возможна благодаря мультвалентности белков, взаимодействующих

с поверхностью клетки. По-видимому, адгезия эритроцитов в присутствии HlyIIICTD происходит за счет наличия двух функциональных сайтов. Ранее мы показали, что HlyIICTD способен связываться с мембранами эритроцитов [2] и эффективно димеризоваться в их присутствии [5]. Можно предположить, что HlyIIICTD вызывает агглютинацию эритроцитов, связываясь с поверхностными гликозаминогликанами через эту пространственную область. На структурах HlyIIICTD и полноразмерного HlyII, предсказанных AlphaFold, эти аминокислоты находятся на поверхности, и вполне вероятно, что полноразмерный токсин HlyII также может взаимодействовать с гликозаминогликанами и обеспечивать агглютинацию эритроцитов. В этом случае лизис клеток не наблюдается. Для определения способности к агглютинации полноразмерным белком HlyII необходимо использовать мутантные формы гемолизина II с нарушением цитолитической функции токсина, поскольку процесс гемолиза может протекать одновременно или опережать агглютинацию эритроцитов. Впервые показанный авторами факт агглютинации эритроцитов фрагментом токсина может иметь значение в функционировании этого токсина. Существует, по крайней мере, два возможных механизма агглютинации эритроцитов, вызванных HlyIIICTD [4].

Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-10026.

Литература

1. Baida G., Budarina Zh.I., Kuzmin N.P. and Solonin A.S. (1999): Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 180(1), 7-14.
2. Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. C-Terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II is able to interact with erythrocytes. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020, 46, 321-326, 10.1134/S1068162020030188
3. Moumen B., Nguen-The C., Sorokin A. Sequence Analysis of Inducible Prophage phIS3501 Integrated into the Haemolysin II Gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ATCC35646. *Genet. Res. Int.* 2012;2012:543286. doi: 10.1155/2012/543286. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22567391; PMCID: PMC3335513
4. Nagel A.S., Rudenko N.V., Luchkina P.N., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Siunov A.V., Brovko F.A., Solonin A.S. Region Met225 to Ile412 of *Bacillus cereus* Hemolysin II Is Capable to Agglutinate Red Blood Cells. *Molecules.* 2023 Apr 19;28(8):3581. doi: 10.3390/molecules28083581. PMID: 37110815; PMCID: PMC10140989.
5. Rudenko N., Siunov A., Zamyatina A., Melnik B., Nagel A., Karatovskaya A., Borisova M., Shepelyakovskaya A., Andreeva-Kovalevskaya Z., Kolesnikov A., Surin A., Brovko F., Solonin A. The C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II oligomerizes by itself in the presence of cell membranes to form ion channels. *Int J Biol Macromol.* 2022 Mar 1;200:416-427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.013. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35041890.

Новые виды актинобактерий рода *Rathayibacter*, ассоциированные с травянистыми и древесными растениями

Оспенников Ю.В.¹, Демидов А.В.¹, Дорофеева Л.В.¹, Стародумова И.П.¹,
Тарлачков С.В.¹, Присяжная Н.В.¹, Субботин С.А.², Евтушенко Л.И.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва
664nod@zoho.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38777

Ключевые слова: *Rathayibacter*, *Microbacteriaceae*, эндофиты, фитопатогены, нематоды

Актинобактерии рода *Rathayibacter*, входящего в семейство *Microbacteriaceae*, представлены фитопатогенами и эндофитами травянистых растений, преимущественно злаковых, произрастающих на территории

Европы, Азии, Австралии и Северной Америки. *R. toxicus*, внесённый в список карантинных микроорганизмов в Австралии, способен к синтезу высокотоксичного гликолипида (коринетоксина) в инфицированных растениях, вызывающего летальные неврологические расстройства у травоядных животных. Для ряда видов отмечена тесная ассоциация с фитонематодами рода *Anguina*, выступающих в роли вектора. В течение долгого времени виды *Rathayibacter* относили к роду *Corynebacterium*, а затем к *Clavibacter*. Позднее виды *Clavibacter*, имеющие менахинон МК-10, пептидогликан на основе диаминоасляной кислоты (L-изомер), рамнозу и маннозу в составе сахаров клеточной стенки, было предложено выделить в отдельный род *Rathayibacter* (Zgurskaya et al., 1993). В настоящее время род включает 9 валидно описанных видов.

В данной работе представлены результаты таксономического изучения новых штаммов бактерий рода *Rathayibacter*, изолированных из свежесобранных и гербарных образцов 10 видов различных травянистых (проломник Козо-Полянского, пижма обыкновенная, кермек, горчак ползучий, качим высокий, тонконог крупноцветковый, коротконожка двуколосковая, дантония калифорнийская, сныть и полынь) и 3 древесных растений (липа, конский каштан, яблоня), в том числе, с признаками инфекции фитопаразитическими нематодами (*Anguinidae*, *Aphelenchoidae*) или поражения членистоногими. Растительные образцы были собраны в период с 1992 по 2020 гг. на территории России (Московская, Белгородская и Волгоградская области), Узбекистана (пустыня Кызылкум) и США (штат Калифорния).

Первичную идентификацию новых изолятов на уровне рода и выявление потенциально новых видов проводили с использованием методов МАЛДИ масс-спектрометрии и анализа генов 16S рРНК. Последующее секвенирование и сравнительный анализ геномов изолятов выявил принадлежность 21 выделенного штамма к 12 не известным ранее видам. Значения уровня ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (25,8–67,8%) и средней идентичности нуклеотидов (82,6–96,0%) между изолятами и типовыми штаммами ближайших видов рода были ниже или в пределах границ разделения видов (70% и 95–96%, соответственно).

Таким образом, были получены новые данные о видовом разнообразии, экологии и распространении актинобактерий рода *Rathayibacter*. Так, штаммы одного вида могут населять ткани разных видов растений, при этом представители двух новых видов обнаруживаются как в травянистых, так и в древесных растениях, которые являются нетрадиционными экологическими нишами для данного рода. Кроме того, с одним и тем же растением может быть ассоциировано более одного (нового) вида *Rathayibacter*. Исследованные штаммы происходят из географически удалённых друг от друга и различающихся климатическими условиями экосистем, что расширяет известный ареал распространения рода. Сформирована и передана в фонд ВКМ коллекция штаммов *Rathayibacter*, включающая представителей новых видов.

Секвенирование и анализ генома бактерии *Zobellia* sp. KMM 6075, выделенной из тихоокеанской зелёной водоросли *Ulva fenestrata*

Отставных Н.Ю.¹, Быстрицкая Е.П.¹, Исаева К.В.², Недашковская О.И.¹, Исаева М.П.¹

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

²Дальневосточный федеральный университет
chernysheva.nadezhda@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38778

Ключевые слова: *Zobellia*, филогеномный анализ, новый вид.

Род *Zobellia* был впервые предложен Barbeugon и др. (2001) для граммотрицательных, строго аэробных бактерий, способных передвигаться посредством скольжения, образовывать желтые или оранжевые колонии на морском агаре, восстанавливать нитраты до нитритов и продуцировать пигменты флексирубинового типа. Было отмечено, что для представителей рода характерна способность к гидролизу галактанов красных морских водорослей, такие как агар, κ-каррагинан и ι-каррагинан, и образованию кислоты из многих сахаров. Содержание Г+Ц в ДНК составляло 42–44 mol%. Филогенетически род был отнесён к семейству

Flavobacteriaceae порядка *Flavobacterales* класса *Flavobacteriia* филума *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*). *Zobellia galactanivorans* является типовым видом рода. В настоящее время род *Zobellia* включает 9 видов бактерий, которые были изолированы из бурых, зелёных и красных водорослей (Barbeyron и др., 2001, 2021, 2023; Nedashkovskaya et al., 2004; 2021), морской воды (Nedashkovskaya et al., 2004) и донных осадков (ZoBell и Upham, 1944; Barbeyron и др., 2001).

Во время изучения эпифитных бактерий, колонизирующих зелёную водоросль *Ulva fenestrata*, обычного обитателя прибрежной зоны Японского моря, был выделен штамм 3Alg 48/1 (= KMM 6075), который образовывал оранжевые колонии на морском агаре. Клетки данного штамма были грамотрицательными, аэробными, оксидазо- и каталазоположительными, росли в пределах 4–41 °C и 1–6% NaCl. Они гидролизировали агар, казеин, желатин, твины 20 и 40, крахмал, альгинат и хитин, и восстанавливали нитраты до нитритов. Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей 16S рРНК гена, показал, что штамм 3Alg 48/1 относится к роду *Zobellia* и что типовые штаммы *Zobellia galactanivorans* DsiJ^T и *Zobellia uliginosa* DSM 2061^T являются его ближайшими соседями с 99.93 и 99.85% сходства последовательностей.

Секвенирование генома KMM 6075 проводили на платформе MiSeq (Illumina, США), сборку *de novo* осуществляли с помощью SPAdes 3.15.3 и аннотацию на серверах RAST и EggNOG. Геном был собран в 93 контига с N50 равным 278819 п.н., размер генома был оценен в 5511878 п.н. (полнота 100%, контаминация 0%). Расчетные геномные показатели ANI, AAI и dDDH между *Zobellia* sp. KMM 6075 и ближайшими типовыми штаммами *Zobellia galactanivorans* DsiJ^T и *Zobellia uliginosa* DSM 2061^T составили 94–96%, 95–96% и 59.1–69.5%, соответственно, что указывает на «пограничные» пороговые значения, применяемые для разделения видов. Таким образом, по данным генетического анализа новый штамм *Zobellia* sp. KMM 6075, выделенный из тихоокеанской зелёной водоросли *Ulva fenestrata*, занимает промежуточное таксономическое положение между двумя недавно разошедшимися видами *Zobellia galactanivorans* и *Zobellia uliginosa* и может рассматриваться как представитель нового вида рода *Zobellia*.

Исследование поддержано Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 15.BRK.21.0004 (соглашение № 075–15-2021-1052).

Литература

1. Barbeyron T., L'Haridon S., Corre E., Kloareg B., Potin P. *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:985-997.
2. Barbeyron T., Thiebaud M., Le Duff N., Martin M., Corre E., Tanguy G., Vandebol M., Thomas F. *Zobellia roscoffensis* sp. nov. and *Zobellia nedashkovskayae* sp. nov., two flavobacteria from the epiphytic microbiota of the brown alga *Ascophyllum nodosum*, and emended description of the genus *Zobellia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021; 71:4913.
3. Barbeyron T., Le Duff N., Duchaud E., François Thomas F. *Zobellia alginiliquefaciens* sp. nov., a novel member of the flavobacteria isolated from the epibiota of the brown alga *Ericaria zosteroides* (C. Agardh) Molinari & Guiry 2020. *Int J Syst Evol Microbiol* 2023; 73:5924.
4. Nedashkovskaya O.I., Suzuki M., Vancanneyt M., Cleenwerck I., Lysenko A.M., Mikhailov V.V., Swings J. *Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:1643-1648.
5. Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., Zhukova N., Guzev K., Chausova V. et al. *Zobellia barbeyronii* sp. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from seaweed, and emended description of the species *Z. amurskyensis*, *Z. laminariae*, *Z. russellii* and *Z. uliginosa*. *Diversity* 2021; 13:520.
6. ZoBell C.E. & Upham H.C. (1944). A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull Scripps Inst Oceanogr Univ Calif* 5, 239–292.

LTTR-зависимый промотор *sgp*-оперона функционирует в отсутствии транскрипционного активатора и эффектора

Позднякова-Филатова И.Ю., Иванова Е.В., Фролова А.А., Захарова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
irafilatova24@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38779

Ключевые слова: регуляция экспрессии генов, РНК-полимераза, промотор, *Pseudomonas*, салицилат, направленный мутагенез, гомологичная рекомбинация.

Регуляторные белки LysR-семейства в присутствии эффектора способствуют закреплению РНК-полимеразы на промоторе, что приводит к активации транскрипции. Характерное расположение функциональных элементов регуляторной области позволяют предположить наличие конститутивной экспрессии подконтрольных генов в отсутствии регуляторного белка и эффектора. Штаммы, в которых удален регуляторный ген, не способны к индуцибельной экспрессии генов, однако оценить потенциальное наличие конститутивной экспрессии невозможно из-за присутствия дивергентно расположенного сильного промотора регуляторного гена.

Гены *sgpA**KGH**B* *P. putida* AK5 участвуют в катаболизме салицилата: *sgpA* кодирует ферредоксин-НАДФ+-редуктазу, *sgpB* – 2Fe–2S ферредоксин, *sgpG* и *sgpH* – большую и малую субъединицы оксигеназного компонента салицилат-5-гидроксилазы, *sgpI* – гентизат 1,2-диоксигеназу, *sgpK* – фумарил-пируват гидролазу (Izmalkova et al., 2013). Регуляторный ген *sgpR* транскрибируется дивергентно относительно генов оперона. Сайт связывания белка SgpR перекрывается с -10 и -35 боксом промотора гена *sgpR*, -35 бокс промотора регуляторного гена перекрывается с -35 боксом промотора *sgp*-оперона (Filatova et al., 2017). Для того, чтобы оценить наличие конститутивной экспрессии генов оперона, были сконструированы следующие штаммы: в *P. putida* AK5dS отсутствовал регуляторный ген, но присутствовал и промотор регуляторного гена, и промотор оперона; в *P. putida* AK5dSP отсутствовал и регуляторный ген, и -10 бокс промотора регуляторного гена; в *P. putida* AK5dSPP отсутствовал и регуляторный ген, и промотор регуляторного гена, и промотор оперона (рис. 1).

И штамм дикого типа, и мутантные штаммы были способны к росту на нафталине: колонии wt и dSP на твердой среде EvansPM были одинакового крупного размера, в то время как колонии dS и dSPP были на порядок мельче, что, по-видимому, происходит из-за накопления салицилата, который оказывает бактериостатический эффект на клетки бактерий. Лаг-фаза при росте на жидкой среде EvansPM с нафталином, в качестве единственного источника углерода, у штамма дикого типа длилась 14 часов, в то время как у мутантных вариантов dS и dSPP 38 и 32 часа соответственно, что может указывать на менее эффективную трансформацию субстрата и ингибирование продуктами метаболизма. Лаг-фаза у штамма с предполагаемой

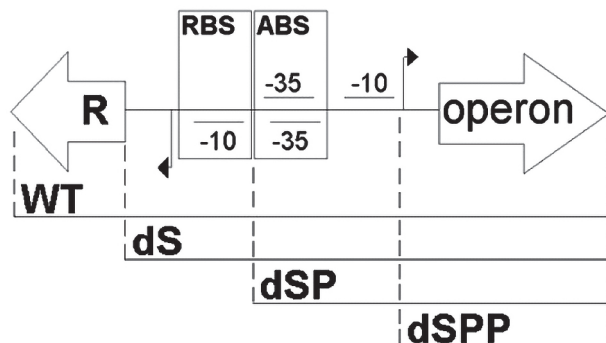


Рис. 1. Схема регуляторной области *sgp*-оперона. R – регуляторный ген *sgpR*, operon – *sgp*-оперон, RBS и ABS – сайты связывания регуляторного белка SgpR, -10 и -35 – консервативные элементы промоторов, WT, dS, dSP, dSPP – отличия в регуляторных элементах межгенной области, между штаммом дикого типа и мутантными штаммами

конститутивной экспрессией генов *sgp*-оперона dSP составила 20 часов. Штамм дикого типа и мутантный вариант dSP имели одинаковую скорость роста, в то время как скорость роста у мутантных вариантов dS и dSPP была значительно ниже.

В отсутствие конкурирующего промотора регуляторного гена мы наблюдаем отсутствие ингибирующего эффекта продуктами метаболизма нафталина (предположительно салицилата), что может указывать на наличие изменений в экспрессии генов *sgp*-оперона.

Литература

1. *Izmailkova T., Sazonova O., Nagornih M. et al.* The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5. *Res Microbiol* 2013;164:244–53. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.12.007>
2. *Filatova I.Yu., Kazakov A.S., Muzafarov E.N., Zakharova M.V.* Protein SgpR of *Pseudomonas putida* strain AK5 is a LysR-type regulator of salicylate degradation through gentisate, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 364, Issue 12, June 2017, fnx112, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx112>.

Новый штамм *Streptomyces* sp. Lzd4kr: морфология, физиолого-биохимические свойства и антимикробная активность

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
v.polvitseva@pbcbras.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38780

Ключевые слова: *Streptomyces*, антимикробное действие, фитопатогены, сканирующая электронная микроскопия.

Микробиологическая защита сельскохозяйственных культур от вредителей является важным элементом современного сельского хозяйства. Основа такой защиты состоит в комплексном использовании различных групп микроорганизмов, а также использовании их вторичных метаболитов, обладающих целевыми свойствами. Наиболее перспективными в этой связи представляются почвенные микроорганизмы, в частности актиномицеты. Актиномицеты – продуценты разнообразных по химическому строению биологических соединений, обладающих антибактериальным, противогрибковым и противоопухолевым действием. Актиномицеты рода *Streptomyces* являются быстрорастущими микроорганизмами, они легко выделяются из природных источников и просты в культивировании [1–2].

Целью нашей работы было изучение нового актиномицета штамм Lzd4kr из коллекции авторов: его морфологии, физиолого-биохимических свойств и филогенетического положения, а также оценка его способности подавлять рост ряда микроорганизмов, в том числе фитопатогенов.

Штамм Lzd4kr был выделен с поверхности кожных покровов ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis*, анализ полного генома показал, что данный штамм относится к роду *Streptomyces*.

Методами световой и электронной микроскопии было показано, что клетки штамма Lzd4kr представляют собой длинные ветвящиеся нити шириной 0,2–2 мкм и длиной до 600 мкм, нити мицелия способны сворачиваться в толстые жгуты толщиной до 8 мкм. Гифы воздушного мицелия с длинными цепочками спор, при этом споры иногда собираются в конгломераты. Воздушный мицелий в колониях, образуемых штаммом Lzd4kr на агаризованных средах (при визуальном наблюдении) окрашен в интенсивный голубой цвет. Клетки штамма Lzd4kr по данным электронной сканирующей и световой микроскопии (фазовый контраст) в качестве вторичных метаболитов продуцируют кристаллическое вещество синего цвета, ассоциированного

со спорами. Характерной особенностью этого штамма по данным сканирующей электронной микроскопии является наличие шиповидных образований по всей поверхности спор.

Температурный диапазон роста для штамма составляет 10–37 °С, при оптимуме 24–30 °С. Результаты исследования показали, что штамм *Streptomyces* sp. Lzd4kr является умеренным галофилом, способным расти при концентрации соли до 9%. Изучение роста при различных значениях pH позволило сделать вывод, что штамм Lzd4kr является нейтрофилом, чей оптимум значений pH лежит в диапазоне 5–9 при оптимуме 7.

Штамм Lzd4kr способен расти на ряде углеводов и сахарах: сахароза, мальтоза, лактоза, глюкоза и глицерин в концентрациях 2%. На жидкой минеральной среде, содержащей один из этих углеводов в качестве единственного источника углерода и энергии, культура выделяла активно пигментированные вторичные метаболиты в среду окрашивая ее в светло серый оттенок.

Оценка антибактериальной активности штаммов была проведена дисково-диффузным методом по способности к формированию зоны ингибирования роста. Для оценки антагонистического воздействия на рост тестируемой культуры использовали: 1) сконцентрированную в 5 раз жидкую культуру штамма и 2) экстракт, полученный экстракцией этилацетатом из культуральной жидкости.

Анализ действия концентрированной культуральной жидкости показал, что штамм Lzd4Kг оказывал ингибирующее воздействие на рост грамотрицательных бактерий *Pectobacterium wasabiae* B15 и *Pseudomonas aeruginosa* ML 4262, на фитопатогенный гриб *Pythium ultimum* F-4782.

Для изучения воздействие экстракта, полученного из культуральной жидкости, исследуемый штамм выращивали на минеральной среде CP1 с глицерином и мальтозой. Для *Streptomyces* sp. Lzd4kr было обнаружено, что экстракт, полученный при росте штамма на среде с мальтозой, оказывал сильнее ингибирующее воздействие, произошло увеличение в 2 раза числа чувствительных к воздействию данного экстракта тест-культур, по сравнению с экстрактами от среды с глицерином. Экстракт, полученный от штамма Lzd4kr после роста на среде с мальтозой подавлял рост следующих штаммов: грамотрицательных бактерий *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518, *Pectobacterium wasabiae* B15, *Pantoea agglomerans* ATCC 27155, *Pseudomonas aeruginosa* ML 4262, грамположительных бактерий *Arthrobacter* sp. B52, *Bacillus cereus* GAST, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus mycoides* KBA4, *Kocuria rosea* B-1236, *Staphylococcus aureus* St35 и фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum* F-132, *Pythium vexans* F-1193, *Alternaria brassicicola* F-1864, *Penicillium gladioli* F-2088, *Bipolaris sorokiniana* F-4006, *Botrytis cinerea* F-4549, *Pythium ultimum* F-4782.

Таким образом, актиномицет *Streptomyces* sp. Lzd4kr обладает выраженной антимицробной активностью, как против ряда бактерий, так и фитопатогенных грибов. Изученные физиолого-биохимические свойства позволяют подобрать оптимальные условия культивирования, в том числе с наибольшим выходом вторичных метаболитов, обладающих антимицробным действием.

Данное исследование было профинансировано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2022-1208.

Литература

1. Bo A.B.; Kim J.D.; Kim Y.S.; Sin H.T.; Kim H.J.; Khaitov B.; Ko Y.K.; Park K.W.; Choi J.S. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. PLoS One 2019, 14, e0222933, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0222933.
2. Le K.D.; Yu N.H.; Park A.R.; Park D.J.; Kim C.J.; Kim J.C. *Streptomyces* sp. AN090126 as a Biocontrol Agent against Bacterial and Fungal Plant Diseases. Microorganisms 2022, 10, 791, doi:10.3390/MICROORGANISMS10040791/S1.

Микробное разнообразие водных ресурсов г. Москвы

Полякова А.Н.¹, Бурмистров Е.М.², Сидорова Т.А.¹, Поляков Н.Б.²,
Соловьев А.И.², Жуховицкий В.Г.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

²НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38781

Ключевые слова: масс-спектрометрия MALDI-TOF, микробиота, идентификация микроорганизмов, водные ресурсы

Вода является одним из наиболее важных источников жизни на планете. Она также может быть источником различных микробиологических угроз для человечества (Трухина и др., 2022). Изучение микроорганизмов, содержащихся в воде, имеет большое значение для обеспечения безопасности питьевой воды и защиты здоровья людей. Актуальным направлением исследования является изучение микробиома водопроводной воды и воды из природных мест обитания с целью возможного обнаружения в ней патогенных микроорганизмов.

В данной работе представлены результаты бактериологического исследования из вод г. Москвы: р. Самородники (ЮЗАО г. Москвы), искусственного пруда (СЗАО г. Москвы), питьевой воды домашнего хозяйства из-под угольного фильтра и водопроводной воды из Химкинского водозаборного узла. Таким образом, были охарактеризованы микробиомы поточных и стоячих вод, а также вода, употребляющаяся в пищу москвичей исследуемых районов г. Москвы.

Посев отобранных проб воды был произведен на следующие среды: агар МакКонки, агар Эндо, 5% бараний дефибринированный кровяной агар, цетримидный агар, маннит-солевой агар и агар Сабуру, после чего чашки Петри инкубировались в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов. Далее была проведена идентификация полученных чистых культур микроорганизмов на масс-спектрометре Ultraflexxtreme (Bruker Daltonik, Германия) и программного обеспечения Maldi biotyper compass explorer 4.1.0.100 и библиотеки версии 10 (10833 записей), дополненной масс-спектрами из собственной коллекции (IHDB).

В результате проведенного исследования были получены данные о видовом разнообразии микробиоты отдельных проточных и стоячих водоемов г. Москвы (рис. 1). Были обнаружены представители бактериальных семейств: *Aeromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Dematiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Yersiniaceae*, а также представители грибной биоты из семейств: *Aspergillaceae*, *Cunninghamellaceae*, *Davidiellaceae*, *Morganellaceae*, и *Pleosporaceae*.

Таким образом, доминантом микробного сообщества из фильтрованной воды были бактерии рода *Sphingobium* (*Sphingobium yanoikuyae*). Сфингомонасы широко распространены в пресноводных, морских и наземных средах обитания. Это связано со способностью бактерий расти и выживать в условиях низкого содержания питательных веществ, поскольку они могут утилизировать широкий спектр органических соединений. Таким образом данный организм имеет потенциал для биоремедиации окружающей среды, так как он разлагает различные ароматические соединения, включая бифенил, нафталин, фенантрен, толуол, м- и п-ксилол (Mitra M. et al., 2020).

Также в фильтрованной воде домашнего хозяйства и в р. Самородника была обнаружена *Klebsiella pneumoniae* из семейства *Enterobacteriaceae* – клинически значимый микроорганизм, являющийся как представителем микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека, так и возбудителем внутрибольничных инфекций.

Искусственный пруд в СЗАО был богат грибами (из родов *Penicillium*, *Absidia*, *Cladosporium*, *Alternaria*) и бактериями семейства *Erwiniaceae* (*Pantoea agglomerans*, *Erwinia persicina*). Микробиом данного водоема характеризовался естественным для данного места обитания видовым составом организмов. Грибы родов *Cladosporium*, *Alternaria* являются условно-патогенными, так как являются аллергическими агентами (Breitenbach, Simon-Nobbe, 2002).

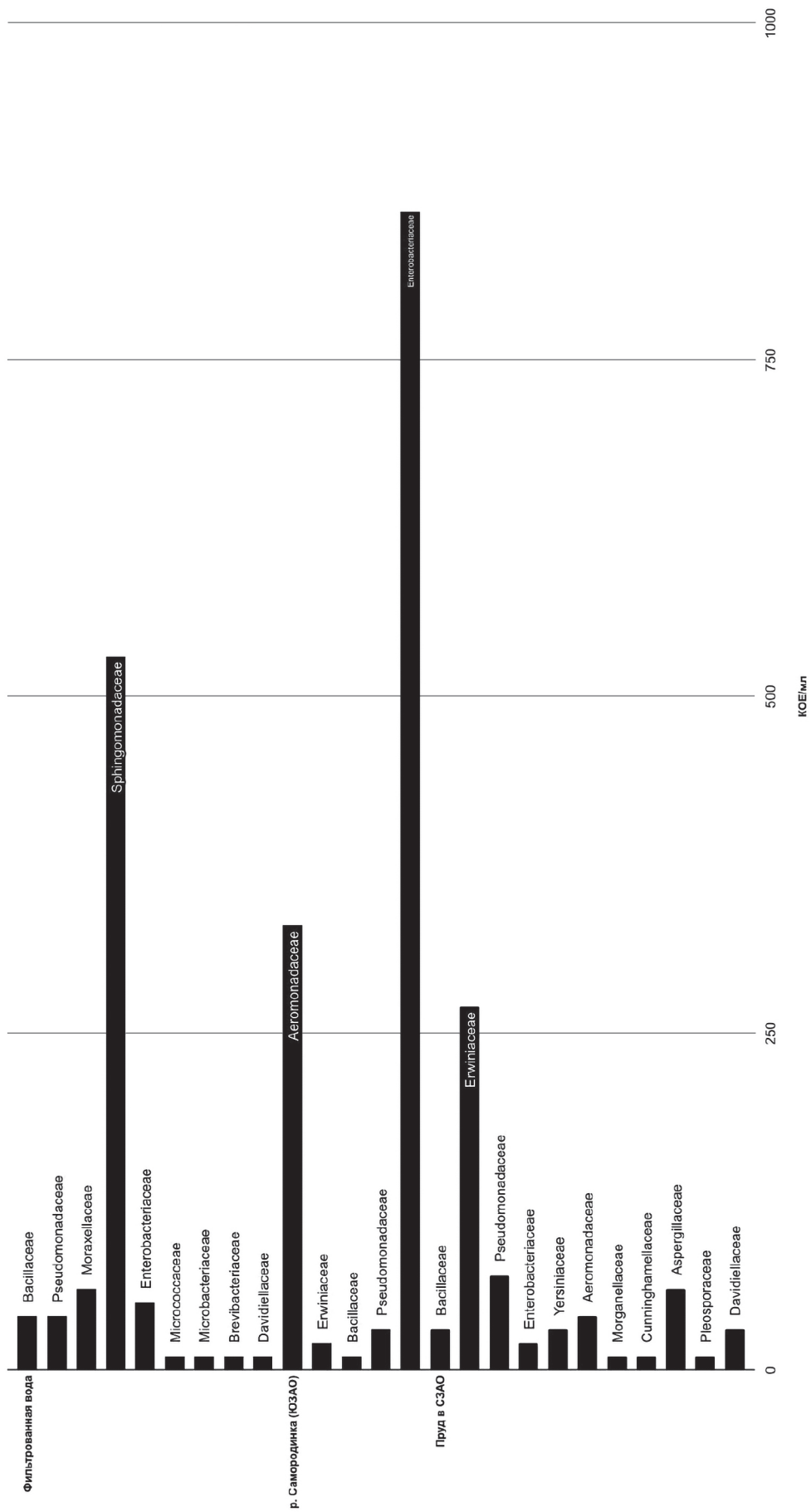


Рис. 1. Результаты идентификации выделенных культур исследованных образцов (КОЕ/мл)

В водопроводной воде культивируемых форм обнаружено не было.

Для оценки эпидемиологической опасности полученных образцов воды мы провели дополнительное исследование, включающее подсчет колониобразующих единиц (КОЕ), после чего полученные данные были сопоставлены с значениями, указанными в СанПиН 2.1.3685-21 (табл. 1).

Таблица 1

Сопоставление результатов со значениями СанПиН 2.1.3685-21

Фильтрованная вода				
Показатели	Норматив (КОЕ/мл)			Результат (КОЕ/мл)
Общее микробное число (ОМЧ) (37±1,0) °С	Не более 50			90
Обобщенные колиформные бактерии	Отсутствие			50
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	Отсутствие			Отсутствие
Энтерококки	Отсутствие			40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствие			Отсутствие
р. Самородинка (ЮЗАО)				
Цель водопользования	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, из поверхностных водоисточников, а также для водоснабжения пищевых предприятий	В зонах рекреации, а также в черте населенных мест		
		Купание	Занятия водным спортом	
Обобщенные колиформные бактерии	Не более 1000	Не более 500	Не более 1000	185
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	Не более 100	Не более 100	Не более 100	70
Энтерококки	Не более 100	Не более 10	Не более 10	50
Пруд в СЗАО				
Обобщенные колиформные бактерии	Не более 1000	Не более 500	Не более 1000	20
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	Не более 100	Не более 100	Не более 100	Отсутствие
Энтерококки	Не более 100	Не более 10	Не более 10	Отсутствие

Показатели КОЕ/мл из образца фильтрованной воды сопоставлялись с таблицей 3.5 «Санитарно-микробиологические и паразитологические показатели безопасности воды систем централизованного питьевого водоснабжения, в том числе горячего водоснабжения». В результате показатели ОМЧ, ОКБ и содержание энтерококков превышали соответствующие нормативные значения.

Образцы из поточной воды (р. Самородинка) и стоячей (искусственный пруд) были анализированы по табл. 3.7 «Санитарно-микробиологические и паразитологические показатели безопасности воды поверхностных водных объектов». В результате все исследованные образцы являются безопасными для использования человеком, но в р. Самородинке было обнаружено превышающее допустимое число бактерий для купания и использования технического водоснабжения бактерий группы кишечной палочки (БГКП) или общих колиформных бактерий (ОКБ), к которым относятся некоторые бактерии из семейства *Enterobacteriaceae* (например, роды – *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*).

По результатам данной работы была создана рабочая коллекция микроорганизмов, которая будет использоваться для следующих научных исследований.

Литература

1. Breitenbach M., Simon-Nobbe B. The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata* // Chemical immunology. 2002. Т. 81. С. 48–72.

2. Mitra M. et al. Isolation and characterization of a novel *Sphingobium yanoikuyae* strain variant that uses biohazardous saturated hydrocarbons and aromatic compounds as sole carbon sources // F1000Research. 2020. Т. 9.
3. СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания».
4. Трухина Г.М., Ярославцева М.А., Дмитриева Н.А. Современные тенденции санитарной микробиологии в реализации санитарно-эпидемиологического надзора за безопасностью водных объектов // Здоровье населения и среда обитания. 2022. Т. 30. № 10. С. 16–24.

Цикл Кребса у облигатного метанотрофа *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z: загадки и факты

Розова О.Н., Мельников О.И., Чистякова (Егорова) С.В., Хмеленина В.Н., Мустахимов И.И.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
rozovaolga1@rambler.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38782

Ключевые слова: метанотроф, *Methylovimicrobium alcaliphilum*, цикл Кребса, малик-фермент, пируват-карбоксилаза.

Галоалкалофил *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z является облигатным метанотрофом, использующим метан (метанол) в качестве единственного источника энергии и углерода. В последнее десятилетие данная группа бактерий интенсивно изучается, особенно с точки зрения возможности биологической конверсии метана в продукт высокой добавочной стоимости. На фоне возросшего интереса было углублено наше понимание метаболических процессов у метанотрофов. На примере *M. buryatense* показано, что долгое время считающийся разомкнутым Цикл Кребса всё же функционирует как цикл при росте на метане, и порядка 50% малата в клетке синтезировано в результате его работы. Тогда как при росте метанотрофа на метаноле, цикл разомкнут, и весь имеющийся в клетке малат является результатом карбоксилирующих реакций. У группы галоалкалофильных метанотрофов рода *Methylovimicrobium*, в зависимости от ростового субстрата поразному происходит перестройка метаболизма. Для *M. buryatense* при росте на метаноле характерно снижение активности высокоэффективного ФФн-зависимого гликолиза и разомкнутость цикла Кребса (Fu et al., 2017, 2019). Тогда как *M. alcaliphilum* при росте на метаноле осуществляет ферментацию формиата за счет усиления тетрагидрометанооптеринового (ТГМП) пути окисления формальдегида (Nguyen et al., 2020). Для *M. alcaliphilum* 20Z роль цикла Кребса остается неочевидной, так как основными поставщиками восстановленных эквивалентов при росте на метане являются реакции глицерофосфатдегидрогеназы и пируватдегидрогеназного комплекса (Nguyen et al., 2020).

Нами было продемонстрировано, что мутантный штамм *M. alcaliphilum* 3E (Δ fumI Δ fumC Δ mae), у которого отсутствуют гены, кодирующие две формы фумаратгидратазы и малик-фермент, выделяет в культуральную среду фумарат в концентрации 2,6 ммоль/г ВСБ при росте на метане и 1,1 ммоль/г ВСБ при росте на метаноле. Наличие в 2 раза больше фумарата при росте метанотрофа на метане указывает на то, что, несмотря на разомкнутость цикла Кребса на уровне реакции гидратации фумарата до малата, данный путь продолжает функционировать, вероятно, за счет активного возобновления пула оксалоацетата карбоксилирующими реакциями, катализируемыми ФФн-зависимой ФЕП-карбоксикиназой (ФФКК) и/или пируваткарбоксилазой (ПК). При росте на метаноле, фумарат образуется из оксалоацетата, аспаратата и аденилосукцината в следствии работы тех же анаплеротических реакций, аминотрансферазы и аденилосукцинатсинтазы и лиазы. ФФКК катализирует обратимое карбоксилирование фосфоенолпирувата в оксалоацетат с образованием ФФн, соответственно, может быть как анаплеротическим ферментом, так и извлекать оксалоацетат из цикла Кребса в основной метаболизм. Реакция, катализируемая ПК, необратима и АТФ зависима.

Полученный нами делеционный штамм *Drus*, у которого отсутствует ПК, очень плохо рос как на метане, так и на метаноле, не достигая ОП более 400, тогда как штамм *Drpck*, с инактивированной ФФКК, не имел фенотипических отличий, что указывает на ПК как на лидирующий карбоксилирующий фермент. Несмотря на отсутствие изменений в ростовых параметрах, у штамма *Drpck* было обнаружено снижение в 5 раз уровня экспрессии гена *mae* (кодирующего малик-фермент) и в 2 раза гена *pus* (кодирующий ПК) при росте на метане, и незначительное повышение экспрессии (на 20%) гена *pus* на метаноле. Снижение экспрессии гена малик-фермента, извлекающего малат из цикла Кребса, является вполне очевидным на фоне отсутствия одной из карбоксилирующих реакций. Интересно, что уровень экспрессии гена *prck* снижался вне зависимости от ростового субстрата в 2 раза в штамме *Δmdh*, характеризующемся отсутствием малатдегидрогеназы, что может указывать на преимущественную работу малатдегидрогеназы в сторону восстановления оксалоацетата до малата – реакция в противовес циклу Кребса. Лимитирование реакции окисления малата может быть также вызвано высоким значением K_m для НАД (0,4 мМ) у МДГ, тогда как значение K_m для НАДН составляет 0,025 мМ.

Хотя ПК, вероятно, катализирует ключевую карбоксилирующую реакцию у *M. alcaliphilum*, однако, уровень экспрессии кодирующего ее гена падал в два раза у делеционных мутантов, имеющих инактивированные ФЕП-синтетазу, ФФКК или малатдегидрогеназу, при росте на метане. На метаноле тоже отмечалось снижение уровня экспрессии данного гена в этих штаммах, за исключением штамма *Drpck*, где наоборот его уровень экспрессии увеличился.

Остаётся неочевидной роль малик-фермента, который необратимо декарбоксилирует малат до пирувата, при этом обладая достаточно высоким значением K_m для малата 5,5 мМ (Rozova et al., 2019). Учитывая свойства, малик-фермент возвращает избыток малата в основной метаболизм, но при каких условиях возникает избыток малата и какие реакции его обуславливают? Экспрессии гена малик-фермента была наиболее чутка на вносимые нами мутации. Так уровень экспрессии упал от 2 до 5 раз в делеционных штаммах по генам, кодирующим ФЕП-синтетазу, ФФКК, малатдегидрогеназу и одну из форм пируваткиназы.

Метаболизм *M. alcaliphilum* 20Z характеризуется своей избыточностью: во взаимопревращении фосфоенолпирувата-пирувата-оксалоацетата-малата участвует 9 ферментов. Единичные делеционные мутации по генам, кодирующим данные ферменты, в большинстве случаев не влияют на фенотип метанотрофа, что указывает на взаимозаменяемость некоторых ферментов или же на гибкость метаболизма. Однако комбинация ряда мутаций, например, $\Delta fumI \Delta fumC \Delta maе$, приводит к неожиданному фенотипу – ферментации фумарата. Мутационный анализ в сочетании с метаболомикой позволяют определить роль того или иного фермента, а также расширить наше понимание функционирования метаболизма метанотрофов, в котором до сих пор остается много черных пятен.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 23-24-00497.

Получение рекомбинантной TAP38 фосфатазы *Arabidopsis thaliana*

Рыжих Ю.С.^{1,3}, Позднякова-Филатова И.Ю.², Ветошкина Д.В.³

¹ Пушинский филиал РОСБИОТЕХ

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

³ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН)

irafilatova24@gmail.com, ryzhikh.yuliya@bk.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38783

Ключевые слова: state transition, фосфатаза, тилакоиды, мембранный белок, хроматография.

Фотосинтезирующие организмы часто подвергаются стрессу, так как находятся в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды. В связи с этим у растений и зеленых водорослей выработался механизм

кратковременной адаптации – state transitions. TAP38 фосфатаза (AT4G27800), расположенная в тилакоидной мембране, участвует в state transitions, фосфорилируя белки светособирающих комплексов. В данной работе описывается получение рекомбинантного белка TAP38.

В базе данных UniProtKB/Swiss-Prot не содержится информации о наличии у TAP38 фосфатазы сигнального пептида. Мы проанализировали аминокислотную последовательность белка с помощью серверов TargetP-2.0 (services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/), LOCALIZER v 1.0.4 (localizer.csiro.au/) и Phobius (phobius.sbc.su.se/). Сервер TargetP-2.0 предсказал наличие сайта отщепления между 41 и 42 аминокислотами, а также между 62 и 63 аминокислотами. Сервер LOCALIZER v 1.0.4 также предсказывает сайта отщепления, но с 1 по 22 аминокислоты. Сервер Phobius не предсказал в белке наличие сигнального пептида. В литературе описывается получение функционально-активного препарата фосфатазы без сигнального пептида с 1 по 40 аминокислоты (диссертация «A study on TAP38: its regulation, site of action and antagonistic function towards STN7»).

MALLRPHLHRFHSNTRLR^HSAYPSADAGGGGLVVYPTYGRHRC^SAIAIDAPSSLTGVTPIRWGY^TSVQ
GFRDEMEDDIVIRSDAVDSFSYAAVFDGHAGSSSVKFLREELYKECVGALQAGSLLNGGDFAAIKEALIKA
FESVDRNLLKWLEANGDEEDESSTATVMIRNDVSFIAHIGDSCAVLSRSGQIEELTDYHRPYGSSRAAIQ
EVKRVKEAGGWIVNGRICGDIASRAFGDIRFKTKKNDMLKKGVDGRWSEKFFVSRIEFKGDMVVATPDI
FQVPLTSDVEFIIASDGLWDYMKSSDVVSYVRDQLRKHGNVQLACESLAQVALDRRSQDNISIIADLGR
TEWKNLPAQRQNVVVELVQAATTIGLTVGIWSSHLS

Аминокислотная последовательность TAP38.

Предсказанные сайты отщепления сигнального пептида отмечены символом «^».

В ходе работы были разработаны праймеры для получения 2-х вариантов рекомбинантной фосфатазы: содержащей с 41 по 388 аминокислоты (TAP38 41-388) и содержащей с 63 по 388 аминокислоты (TAP38 63-388). Для клонирования был выбран вектор pET19mod. На N-конце аминокислотной последовательности содержится последовательность из 6 гистидинов. Для клонирования использовали метод T5 exonuclease DNA assembly (TEDA).

В качестве штамма-продуцента выбрали *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Данный штамм трансформировали рекомбинантными плазмидами, содержащими последовательность либо TAP38 41-388, либо TAP38 63-388. Трансформанты выращивали до оптической плотности 0,4, добавляли 20 мкМ ИПТГ и культивировали клетки в течение 18 часов при 18 °С.

Биомассу разрушали ультразвуком 4 мин: 30 с воздействие УВ, 30 с перерыв. Далее получали клеточные обломки и ресуспендировали их в буфере состава: 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, в качестве денатурирующего агента использовали 8М мочевины. Белки очищали методом аффинной хроматографии на Ni-NTA колонке с постепенной ренатурацией белка. Проводили последовательную промывку буферами, понижая содержание мочевины. Составы буферов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Буфер для промывания 1	100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 8М мочевины
Буфер для промывания 2	100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 4М мочевины
Буфер для промывания 3	100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 2М мочевины, 5 мМ CHAPS
Буфер для промывания 4	100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1 М мочевины, 5 мМ CHAPS
Буфер для для элюции	100 мМ калий-фосфатный буфер (pH = 8,0), 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, 5 мМ CHAPS

Для диализа использовали полупроницаемую мембрану с размером пор 14 MWCO.

В результате данной работы получены препараты белка TAP38 63-388 с концентрацией 0,1 мкг/мкл и TAP38 41-388 с концентрацией 0,06 мкг/мкл. Активность белка будет проверена с использованием тилакоидов мутантных растений *Arabidopsis thaliana*, не содержащих TAP38 фосфатазу.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-74-10088.

Выявление скрытых сообществ солонатоводных амебидных протистов в пресноводных биотопах Ладожского озера

Рябушева У.Д.^{1,2}, Кудрявцев А.А.¹

¹Лаборатория клеточной и молекулярной протистологии (Зоологический институт РАН)

²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена
ryabysheva1411@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38784

Ключевые слова: экология протистов, распространение протистов, скрытые сообщества, скрытое биоразнообразие, Amoebozoa, Heterolobosea, абиотические факторы среды, соленость.

Современные модели географического распространения протистов подразумевают их пассивный перенос вместе с потоками вещества в атмосфере. Различные виды формируют активные сообщества в тех микробиотопах, где они находят для себя благоприятные условия (Fenchel, Finlay, 2004). Одной из удобных групп для изучения закономерностей формирования этих сообществ являются амебидные протисты. Как и другие микроорганизмы, они обладают рядом особенностей, которые могут способствовать их пассивному распространению. Микроскопические размеры, высокая численность и приуроченность амеб к взвешенным частицам обеспечивают их перемещение из одного биотопа в другой, в результате чего они могут сталкиваться с неблагоприятными условиями и давлением лимитирующих факторов. Считается, что соленость среды является фактором, четко разграничивающим фауну амебидных протистов по их способности к осморегуляции – большинство видов приурочено либо к пресным, либо к соленым биотопам (Page, 1988). Случаи одновременного обнаружения одних и тех же видов в пресных и солонатоводных водоемах крайне редки. С учетом имеющихся представлений о механизмах распространения протистов в биосфере, мы можем предположить, что если виды попадают в водоемы с неблагоприятной для них соленостью, то могут формировать в них метаболически неактивные покоящиеся стадии, тем самым составляя компоненты скрытого сообщества. Если эта гипотеза верна, то с помощью искусственного изменения солености среды мы можем выявлять компоненты скрытого сообщества в этих биотопах.

Для проведения эксперимента из залива Мусталахти (Карелия; 61°30'25" с.ш., 30°16'05" в.д.) были отобраны пробы воды с органической взвесью. Для выявления амебидных протистов использовали метод обогащающего культивирования (Smirnov, 2003) с добавлением в высевы стерильных зерен пшеницы в качестве источника органики. Пробы высевали в стерилизованную искусственную морскую воду, разбавленную до значений солености 0,3‰, 18‰ и 30‰. Инкубация проводилась при стандартных условиях: температуре 17–18 °С и нерегулируемом искусственном освещении. Из высевов в среду с соленостью 0,3‰ были выделены четыре штамма амеб. Из высевов в среду с соленостью 18‰ выделены три других штамма. В посевах в среду с соленостью 30‰ активные трофические стадии амебидных протистов обнаружены не были. В ходе исследований были получены клональные культуры выделенных штаммов и изучены их морфологические особенности при помощи методов световой микроскопии. Была проведена предварительная идентификация амеб по морфологическим признакам. Пресноводные штаммы морфологически сходны с представителями отрядов Vannellida, Dactylopodida (Amoebozoa), а также с представителями семейства Vahlkampfiidae (Heterolobosea). Морфология солонатоводных штаммов сближает их с семействами Vahlkampfiidae и Guttulinopsidae (Heterolobosea). Для более точной идентификации из клональных культур была выделена геномная ДНК, из которой амплифицировали ядерные и митохондриальные маркеры с целью определения видов и реконструкции их филогенетических взаимоотношений. Несмотря на выявление амеб в среде с соленостью 18‰, по предварительным данным, два из трех выделенных солонатоводных штаммов могут выдерживать такую соленость лишь ограниченное время. Для поддержания активности этих двух штаммов соленость среды была понижена до 15‰ и 10‰ соответственно.

Показано, что при изменении фактора солености среды происходит смена одного активного сообщества амебодных протистов на другое, что говорит о наличии скрытого биологического разнообразия этих организмов в природных биотопах (в нашем случае – солоноватоводных видов в пресноводных водоемах).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 20-14-00181.

Литература

1. Fenchel T., Finlay B.J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity/ T. Fenchel, B. J. Finlay // *BioScience*. – 2004. – Vol. 54, №8. – P. 777–784.
2. Smirnov A.V. Optimizing methods of the recovery of gymnamoebae from environmental samples: a test of ten popular enrichment media, with some observations on the development of cultures / A.V. Smirnov // *Protistology*. 2003. Vol. 3, №1. P. 47–57.
3. Page F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae / F.C. Page // *Freshwater Biological Association*. 1988.

Проявление антагонизма у дрожжей, выделенных из сельскохозяйственных культур, по отношению к фитопатогенным грибам

Савченко В.Е.^{1,2}, Качалкин А.В.^{1,2}

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
Отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов»

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
vesavchenko21@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38785

Ключевые слова: антагонизм, эндофитные дрожжи, биоконтроль фитопатогенов.

Возможность использования микроорганизмов, населяющих внутренние ткани растений, для производства высокоэффективных биопрепаратов делает эту тему все более привлекательной для исследования [1]. Практика активного использования фунгицидов и устанавливаемые правительственными организациями ограничения подтолкнули исследователей к изучению и развитию новых систем для контроля болезней сельскохозяйственных культур. Среди перспективных вариантов многообещающими выглядят именно агенты биоконтроля [2]. Последние исследования показали, что непатогенные дрожжи могут противостоять предурожайным и постурожайным заболеваниям растений. Их практическое применение в качестве агентов биологического контроля зависит от силы их антагонистической активности, а также спектра микроорганизмов, против которых их можно будет использовать. Среди микроорганизмов, потенциально проявляющих подобные свойства, именно дрожжи являются наиболее безопасными для потребления в пищу ввиду их естественного сосуществования с растениями, а также невозможности синтезировать токсичные вторичные метаболиты [3].

Целью работы было исследование антагонизма наиболее распространенных видов дрожжей-эндофитов из сельскохозяйственной продукции по отношению к фитопатогенным грибам.

Объектами исследования стали 103 штамма эндофитных дрожжей, относящихся к 17 видам и 9 родам, которые наиболее часто выделяются из внутренних тканей сельскохозяйственных культур. Для тестирования были использованы 16 штаммов фитопатогенных грибов, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов и относящихся к 8 видам: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ustilago maydis*.

В ходе работы был использован метод посева «культура против культуры», который позволяет вести скрининг перспективных продуцентов фунгицидных веществ. Для количественной оценки антагонистичес-

кой активности был произведен замер расстояния между краем колонии фитопатогенного гриба и штрихом штаммов дрожжей-эндофитов.

На первом этапе работы было поставлено и обработано 2060 тестов на средах сусло-агар (МА) и картофельно-декстрозный агар (PDA) с использованием 10 штаммов фитопатогенов, относящихся к видам *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Проявление антагонизма к фитопатогенным грибам при совместном культивировании показано для 20% исследованных штаммов дрожжей-эндофитов из отделов Ascomycota и Basidiomycota. Аскомицетные дрожжи гораздо чаще продуцируют биологически активные вещества и формируют зону отсутствия роста фитопатогенов по сравнению с базидомицетными дрожжами.

Для 47 из 103 исследованных штаммов эндофитных дрожжей обнаружено проявление антагонистической активности в виде формирования зоны отсутствия роста. Штаммы видов *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula babjevae*, *Yarrowia deformans*, *Yarrowia lipolytica* показали наибольшую антагонистическую активность в ходе тестирования. Для *Metschnikowia pulcherrima* и *Aureobasidium pullulans* выявлены наиболее широкие спектры подобной активности.

В ходе анализа региональной приуроченности эндофитных дрожжей, выделенных из сельскохозяйственной продукции России и зарубежных стран, не было выявлено различий в проявлении антагонизма.

Среди фитопатогенов наиболее чувствительными к воздействию эндофитных дрожжей при совместном культивировании на средах МА и PDA оказались штаммы *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Исследованные виды фитопатогенов продемонстрировали сильную штаммовую специфичность при совместном культивировании с одними и теми же штаммами дрожжей. Выявлены различия в антагонистической активности при использовании разных питательных сред.

На втором этапе работы были отобраны 15 наиболее активных культур дрожжей, проявившие антагонизм одновременно против нескольких штаммов фитопатогенов и представленные следующими видами: *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Yarrowia lipolytica*. Было проведено дополнительное тестирование данных культур дрожжей против исходных видов фитопатогенов с добавлением 6 штаммов фитопатогенов, относящихся к видам *Fusarium graminearum*, *Penicillium digitatum* и *Ustilago maydis* на среде глюкозо-пептонный агар (ГРПА), предназначенной специально для выявления фунгицидных веществ.

При совместном культивировании на среде ГРПА наибольшую чувствительность по отношению к отобраным активным дрожжам-эндофитам показали виды *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Ustilago maydis*. Наиболее уязвимым для антагонистической активности дрожжей-эндофитов оказался вид *Penicillium digitatum*, для которого зона отсутствия роста различной ширины при совместном культивировании наблюдалась во всех случаях тестирования.

Наибольшую активность против фитопатогенов показали штаммы вида *Aureobasidium pullulans*. Формирование зоны отсутствия роста было отмечено более чем в 40% случаев. Результаты количественной оценки подтверждают перспективность дальнейшего исследования культур *Aureobasidium pullulans*, так как они работают против широкого спектра фитопатогенов и формируют наиболее широкую зону отсутствия роста микромицетов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

Литература

1. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 1. С. 19–32.
2. Durel L., Estrada-Peña A., Franc M., Mehlhorn H., Bouyer J. Integrated fly management in European ruminant operations from the perspective of directive 2009/128/EC on sustainable use of pesticides // Parasitology research. 2015. V. 114. № 2. P. 379–389.
3. Sipiczki M., Selim S.A. Antagonistic yeasts from a salt-lake region in Egypt: identification of a taxonomically distinct group of phylloplane strains related to *Sporisorium* // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. V. 112. № 4. P. 523–541.

Культивируемые микроскопические грибы в аэротенках водоочистного сооружения

Сайнчук А.Д.^{1,2}, Александрова А.В.², Щеголькова Н.М.²

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов»

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
alexandra49@inbox.lv

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38786

Ключевые слова: биологическая очистка вод, биоремедиация, микоремедиация, активный ил.

Биологическая очистка вод получает всё большее распространение. Так, все городские стоки Москвы проходят очистку в сооружениях, использующих технологию активного ила. Биоремедиация обладает рядом преимуществ: эффективностью, простотой, надёжностью и относительно невысокой стоимостью. Организмы активного ила, бактерии, грибы, водоросли и представители микрофауны, в процессе жизнедеятельности окисляют, ферментируют, иммобилизируют, адсорбируют и способствуют выведению из воды загрязняющих веществ [1]. Спектр удаляемых поллютантов включает растворимые органические вещества, аммоний, фосфаты, сульфиды и другие соединения [2, 3]. Грибы являются важной составляющей системы активного ила. Они напрямую участвуют в процессах биodeградации и вносят значительный вклад за счёт высокого ферментативного потенциала, метаболизации и накопления загрязнителей. Грибной мицелий служит каркасом для формирования бактериально-грибных флокулов – основных «рабочих» единиц активного ила. Также мицелий осуществляет микрофилтрацию – процесс удаления токсичных соединений [3, 4]. На практике сообщество грибов часто игнорируется, несмотря на значимость этой группы для эффективности функционирования очистного сооружения и биоремедиации. Оценка представленности, изучение сезонной динамики, исследование физиологических и биохимических особенностей микромицетов из систем водоочистки могут помочь лучше понять их роль в процессе очистки и то, как использовать их в синергии с бактериальным компонентом [4].

Цель работы – качественно и количественно охарактеризовать разнообразие микроскопических культивируемых грибов на аэробной стадии процесса биологической очистки вод по технологии активного ила.

В работе были использованы образцы из городского очистного сооружения г. Подольск МУП «Водоканал». Пробы представляли собой жидкую иловую суспензию. Забор материала проводили из пяти аэротенков-вытеснителей из зон аэробной стадии II в летний период. Суммарно отобрали 5 проб.

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

Представленность видов оценивали по показателям относительного обилия. В качестве показателя разнообразия видов в работе использовали индекс разнообразия Шеннона. Для получения наглядной картины сравнения состава микромицетов из разных аэротенков был использован метод ординации, который позволяет расположить комплексы видов из каждого образца вдоль гипотетических осей, опираясь на данные видового состава и представленности. Для этой цели был проведен анализ методом главных компонент в программе RCO3.

В образцах было выявлено 33 вида микромицетов. Их количество в каждом конкретном образце варьировало от 19 до 27. Индекс разнообразия Шеннона изменялся в пределах 1,72–2,4, что говорит о схожем уровне разнообразия микологического сообщества различных аэротенков. Результаты ординации подтверждают эти

данные. Однако комплексы видов из 2 аэротенков обособляются на диаграмме ординации с учетом относительного обилия. В этих аэротенках доминирующую позицию по относительному обилию занимает *Mucor circinelloides*, в остальных аэротенках – *Aspergillus section Nigri*.

Доминантными видами во всех исследованных аэротенках оказались *Mucor circinelloides* и *Aspergillus section Nigri*. В исследованных образцах два этих вида в совокупности занимают от 37 до 75% микологического состава по показателю относительного обилия. Согласно литературным данным, *Mucor circinelloides* с высокой эффективностью способствует естественному обезвоживанию ила, что сокращает существенные затраты на транспортировку и утилизацию осадка. Ряд авторов отмечают высокий биоремедиационный потенциал вида: удаление тяжелых металлов и органических соединений, в частности, полифосфатов. *Aspergillus* из секции *Nigri* участвует в утилизации стойких и текстильных красителей, пестицидов, тяжелых металлов и ароматических соединений.

Среди минорных видов оказались представители родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida*, *Geotrichum*, *Phoma*. Наличие грибов из этих родов является характерным для активного ила.

Ряд научных источников указывает на то, что обнаруженные виды потенциально могут очищать воду от широкого спектра загрязнителей, таких как стойкие органические загрязнители (пентахлорбифенил), полициклические ароматические углеводороды, фенолы, соединения нефти, металлы и прочие. В то же время наличие представителей некоторых родов может оказаться нежелательным. Так, грибы из рода *Fusarium* при чрезмерном развитии могут приводить к вздуванию ила, что снижает эффективность работы очистного сооружения. Согласно проведенному исследованию таксономического состава микромицетов из аэротенков, культивируемые микроскопические грибы разнообразны и обильны в данном типе местообитаний и, вероятно, играют существенную роль в функционировании водоочистных сооружений. Эта работа также подчеркивает важность периодического мониторинга грибного сообщества в системах биологической очистки вод.

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

The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project no. 075-15-2021-1051.

Литература

1. Márquez P., Gutiérrez M.C., Toledo M., Alhama J., Michán C., Martín M.A. Activated sludge process versus rotating biological contactors in WWTPs: Evaluating the influence of operation and sludge bacterial content on their odor impact // Process Safety and Environmental Protection. 2022. Vol. 160. P. 775–785.
2. Zhang X., Liu Y. Resource recovery from municipal wastewater: A critical paradigm shift in the post era of activated sludge // Bioresource Technology. 2022. Vol. 363. P. 358–384.
3. Zhu X., Qi J., Cheng L., Zhen G., Lu X., & Zhang X. Depolymerization and conversion of waste-activated sludge to value-added bioproducts by fungi // Fuel. 2022. Vol. 320. P. 293–324.
4. Buratti S., Girometta C.E., Baiguera R.M., Barucco B., Bernardi M., De Girolamo G., Savino E. Fungal diversity in two wastewater treatment plants in North Italy // Microorganisms. 2022. Vol. 10(6). P. 1–17.

Происхождение и распространение неканонической регуляторной кальцийсвязывающей петли литических пептидаз подсемейства M15_C

Тарлачков С.В.^{1,2}, Микулинская Г.В.¹

¹ Филиал Института биоорганической химии РАН

² ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
sergey@tarlachkov.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38787

Ключевые слова: пептидогликангидролаза, бактериофаг, лизис бактерий, регуляторный кальций, эволюция.

Литические цинкосодержащие пептидазы подсемейства M15_C – большая группа фагоспецифических эндолизинов, разрушающих пептидогликан клеточной стенки на заключительной стадии цикла развития фага, обеспечивая лизис клеточной стенки бактерии- хозяина изнутри для выхода зрелого фагового потомства во внешнюю среду. Ферменты подсемейства M15_C имеют общие структурные черты, в частности, каталитический цинк координирован двумя остатками гистидина и одним – аспартата; еще один аспартат участвует в нуклеофильном замещении при гидролизе пептидной связи. Некоторые белки подсемейства, например, эндолизины фага T5 энтеробактерий (EndoT5) и фага 3 аэромонад (EndoA3), помимо каталитического цинка, связывают ион кальция, выполняющий роль активатора. С помощью точечного мутагенеза и последующего структурного анализа EndoT5 было показано, что ион Ca^{2+} связывается посредством особой петли состава DWNasGdyhDE, имеющей конвергентное сходство с канонической EF-подобной петлей кальцийсвязывающих белков эукариот. В отличие от канонической, конвергентная петля EndoT5 имеет низкое сродство к кальцию: константа диссоциации составляет 0.2 мМ. Вероятно, биологический смысл кальциевой регуляции – периплазматическая активация фермента непосредственно рядом с субстратом-мишенью пептидогликаном. Эндолизины во время фаговой инфекции синтезируются в цитоплазме, где концентрация Ca^{2+} гораздо ниже константы диссоциации, и остаются неактивными. Активация происходит в периплазме, являющейся «депо» кальция в грамотрицательной бактериальной клетке с концентрацией этих ионов до 1 мМ. Таким образом, для некоторой части белков подсемейства M15_C ион кальция служит своеобразным триггером лизиса. Дополнительный уровень регуляции фаголизиса периплазматическим Ca^{2+} дает фагу эволюционное преимущество и позволяет предположить распространенность такого пути среди фагов грамотрицательных бактерий. Целью настоящей работы было проанализировать встречаемость EF-подобной петли среди всех белков в таксоне Viruses в целом, чтобы расширить представления о регуляторной роли кальция.

Поиск в базах данных вели, задав в качестве критерия вырожденную последовательность EF-подобной петли EndoT5 GxDWxxGxxxDE. Было обнаружено 55 уникальных белковых последовательностей; повторяющиеся последовательности, а также открытые рамки считывания из бактериальных профагов или метагеномов не учитывали, поскольку в последних гены могут быть молчащими, а их продукты – потерять функциональность без эволюционного давления. Найденные последовательности представлены в виде дерева на рис. 1; на дереве близкородственные ветви одной группы свернуты для удобства восприятия. Оказалось, что все 55 найденных гипотетических белков с EF-подобной петлей представляют подсемейство пептидаз M15_C, а значит, и кальциевая регуляция встречается только у них. Потенциальные ферменты принадлежат бактериофагам, инфицирующим грамотрицательные бактерии: преимущественно фагам группы энтеробактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Pectobacterium*, но также имеется 6-членная группа фагов *Aeromonas* и фаг морской факультативно анаэробной бактерии рода *Shewanella*.

Сходство EF-подобной петли с каноническими EF-мотивами очевидно конвергентное; трудно сказать определенно, возникла петля однократно у общего предка, распространившись затем с помощью горизонтального переноса генов, или это произошло независимо у нескольких таксономических групп фагов, пере-

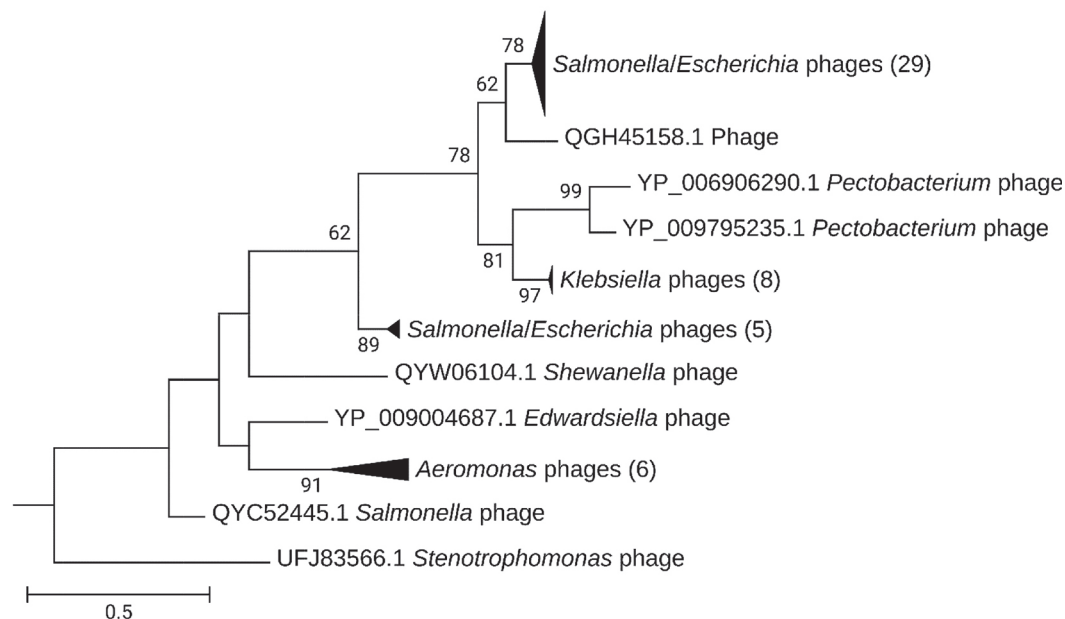


Рис. 1. Эволюционные взаимосвязи 55 белковых последовательностей эндолизинов бактериофагов с кальцийсвязывающей EF-подобной петлей

даваясь затем внутри этих групп. В поисках ответа на этот вопрос мы проанализировали 210 ортологичных пептидаз подсемейства M15_C, как с кальцийсвязывающей петлей, так и без петли, с точки зрения их общего сходства. Большая смешанность обеих групп белков, а также существенное разнообразие таксонов хозяев и самих фагов позволяет предположить, что кальцийсвязывающая петля возникла независимо как минимум у двух групп фагов: фагов энтеробактерий и фагов аэромонад. Действительно, ион кальция способен координироваться различным числом связей от 3 до 8, поэтому ключевых аминокислот в конвергентной петле всего три: к ним относятся первый аспаргат, полярная аминокислота в положении 3 и глицин в положении 6. Таким образом, достаточно двух-трех мутаций, чтобы возникла кальцийсвязывающая петля; учитывая частоту мутаций у прокариот, это вполне вероятное событие. Можно заключить, что активация периплазматическим кальцием как дополнительный уровень регуляции фаголизиса – результат коэволюции бактериофагов и их грамотрицательных хозяев.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-24-00210.

Факторы внешней среды, влияющие на процессы биоповреждения материалов грибами

Токарев В.А., Третьякова О.М.

Гродненский государственный университет им. Янки Купалы
Beerpak@mail.ru, tretjakova_om@grsu.by

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38788

Ключевые слова: Биоповреждение, микромицеты, влажность субстрата, кислотность субстрата, температурные границы

Основным фактором, способствующим развитию микроорганизмов является влажность субстрата. При обильном содержании влаги или соприкосновении с жидкостью (градирни, резервуары, трубопро-

воды, коллекторы и т.д.), на поверхности и толще материалов активно развиваются микроскопические грибы.

Если материал имеет незначительную влажность, то сначала появляются менее требовательные к влажности грибы, а затем уже начинают развиваться более влаголюбивые виды или такие, для которых первые микромицеты являются питательной средой.

Самая низкая относительная влажность воздуха, поддерживающая рост плесневых грибов, составляет приблизительно 75%, для активного роста грибов рода *Stachybotrys* – более 93%. Оптимальная температура и достаточное количество питательного субстрата могут привести к развитию некоторых видов грибов и при более низкой относительной влажности, но не менее 60% (Nolard, 1997).

Хотя для роста мицелия необходимо достаточное количество влаги, конидии и другие структуры, предназначенные для сохранения вида в неблагоприятных условиях, хорошо переносят длительное высушивание.

Одним из важных факторов влияния внешней среды на колонизацию грибами природных и промышленных материалов и изделий является кислотность субстрата. Различают минимальное, оптимальное и максимальное значения pH для роста, спорообразования и физиологической активности грибов. У многих видов грибов в зависимости от кислотности среды могут изменяться культуральные и морфологические признаки: окраска среды и колонии, характер роста мицелия, размеры и форма органов размножения, образование хламидоспорного типа клеток и др. (Баринаова, 2010).

Кардинальные значения и оптимум pH для роста и спороношения зависят от условий культивирования и, прежде всего, от состава питательной среды, температуры, аэрации. Грибы интенсивно растут при крайних значениях pH после соответствующего периода адаптации, различного у разных видов (Баринаова, 2010).

Оптимальным значением реакции среды для большинства грибов является pH 4,0–5,0. Однако в процессе роста грибы изменяют кислотность среды в благоприятную сторону за счет выделения из клетки метаболитов или ферментов, вызывающих это изменение (Ильичев, 1987).

На рост грибов и их физиологическую активность влияет и температура. Диапазон благоприятствующих развитию температур широк и зависит от особенностей микроорганизмов. В природных условиях мицелиальные грибы развиваются в средах с разными температурными условиями. Максимальная температура развития грибов может составлять 45 °С, а минимальная – 0 °С. Организмы, оптимум роста и развития которых находится в границах от 0 до 18 °С, относят к группе психрофилов. Многочисленные представители этой группы развиваются в осенне-зимний период. В нашей климатической зоне наибольший урон наносят представители группы мезофилов, с оптимумом развития в пределах от 20 до 40 °С. К этой группе относятся и грибы, представляющие опасность для здоровья людей и теплокровных животных (Ильичев, 1987).

Каждый вид и даже штамм имеет свои температурные границы. Воздействие слишком низких или слишком высоких температур приводит к глубоким нарушениям в координации процессов жизнедеятельности, к необратимым повреждениям цитоплазмы. Если температура снижается до критической, прекращается движение цитоплазмы, утрачивается полупроницаемость мембран, и клетка гибнет. Высокая температура также приводит к гибели клетки вследствие нарушения мембран, наступающего в результате инактивации и денатурации белков и расстройств обменных процессов.

Темноокрашенные мицелиальные грибы различны по отношению к температурам и относятся, как к термо-, мезо- так и психрофилам. При оптимальных для роста температурах грибы проявляют большую толерантность к чрезвычайно низкой или высокой влажности и, наоборот, при оптимальной влажности микроорганизмы толерантны к экстремальным изменениям температуры.

Жизнеспособные мицелиальные грибы были обнаружены на разных глубинах в интервале от верхних горизонтов до 651-метрового слоя, возраст которого составляет примерно 35–40 тыс. лет. Среди обнаруженных в толще ледника видов мицелиальных грибов особый интерес представляет *Alysidiium resinae*, черный гриб, образующий пигмент меланин, характерный для многих аборигенных форм. Выделенные из ледника штаммы, как и музейные штаммы тех же видов, растут при довольно широком диапазоне температуры. Однако большинство штаммов, выделенных из ледника, растет при более низкой температуре, при которой музейные штаммы тех же видов еще не растут. Очевидно, штаммы из толщи ледника обладают более психротолерантными свойствами, чем музейные штаммы тех же видов (Абызов, 1982).

Пещерные психрофильные и психротолерантные микромицеты в диапазоне температур от 4 до 21 °С выигрывают конкуренцию у мезофильных грибов за счёт существенно более короткой лаг-фазы, более высокой максимальной удельной скорости роста мицелия и удельной скорости образования новых точек роста (Илиенц, 2010).

Литература

1. *Абызов С.С., Белякова Л.А.* Мицелиальные грибы из толщи ледника Центральной Антарктиды // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 3. С. 432–435.
2. *Баринова К.В.* Органические кислоты микромицетов-биодеструкторов. Экологическое значение, метаболизм, зависимость от факторов среды / К.В. Баринова, Д. Власов, С. Щипарёв. – LAP LAMBERT Academic Publishing, 2010. 80 с.
3. *Илиенц И.Р.* Перспективы практического использования микромицетов карстовых пещер Средней Сибири // Тез. докл. XVII Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных 12-15 апреля 2010 г. – М.: МГУ им. М.В.Ломоносова, 2010. С. 153.
4. *Ильичев В.Д.* Биоповреждения: учебное пособие для биолог. спец. вузов / под ред. В.Д. Ильичева. – М.: Высшая школа, 1987. С. 352.
5. *Nolard N.* Moulds and respiratory allergies / N. Nolard // Expressions. 1997. N 5. P. 7–9.

Применение интегративной таксономии для решения проблем видовой идентификации инфузорий рода *Euplotes* (Ciliophora, Euplotidae)

Трибун М.М.

ФГБУН Зоологический институт РАН
ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет телекоммуникаций
им. проф. М.А. Бонч-Бруевича
tribunmikhail@gmail.com

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38789

Ключевые слова: инфузории, интегративная таксономия, молекулярная биология, морфология, *Euplotes*

Свободноживущие инфузории (Ciliophora) – это одна из наиболее высокоорганизованных групп одноклеточных протистов, повсеместно распространенная в пресных, морских и почвенных биотопах. Оценки глобального видового разнообразия ресничных протистов довольно противоречивы и составляют, по разным сведениям, от 3 до 40 тыс. видов. Однако, в среднем, принимается равным 8-9 тыс. видов.

Род *Euplotes* Ehrenberg, 1831 представляет собой многочисленную группу инфузорий, включающую в себя более 160 видов. Многие *Euplotes* активно используются в качестве модельных организмов при исследовании механизмов адаптации к низким температурам, изучения типов спаривания, географического распространения эукариот и др. Традиционно представителей *Euplotes* можно идентифицировать по набору следующих признаков: размеры и форма тела, локализация и количество цирр на вентральной стороне клетки, хорошо развитые мембранеллы адоральной зоны, наличие или отсутствие дорсальных гребней, С-образный макронуклеус, число дорсальных кинет и рисунок дорсального аргирома. Указанные выше признаки позволяют даже начинающему цилиатологу выявить *Euplotes* среди множества других видов инфузорий. Тем не менее, видовое определение ресничных протистов рассматриваемой группы сопряжено с рядом трудностей: большинство видов имеют сходные диагностические признаки (например, число цирр и дорсальных кинет); многие ранние исследования не включали в себя важную информацию, необходимую для видового определения (например, рисунок дорсального аргирома); малое количество молекулярных данных; многие нуклеотидные последовательности были отнесены к видам, без предоставления данных светооптических и гистохимических исследований. Таким образом, становится очевидно, что видовое определение инфузорий обязательно должно включать в себя как традиционные морфологические приемы, в особенности метод импрегнации соматической цилиатуры, так и проведение филогенетического анализа на основе полученных нуклеотидных последовательностей определенных маркерных генов.

В данном исследовании на примере двух видов (*Euplotes japonicum* Tribun, 2022 и *E. aediculatus* Pier-son, 1943) показано применение интегративного подхода к видовому определению инфузорий. Помимо традиционных светооптических исследований были использованы гистохимические техники (окраска ядерных структур по Фельгену и «влажный» метод импрегнации для выявления инфрацилиатуры), а также получены нуклеотидные последовательности маркерного гена 18S рРНК с проведением филогенетического анализа.

Euplotes japonicum Tribun, 2022 (рис. А-Г)

Морфологическое описание. Средний размер клеток – 94×47 мкм. Форма тела овальная, концы плавно закруглены. Перистом широкий и глубокий, составляет около 70% от длины клетки. Адоральная зона несет от 41 до 52 мембранелл (АЗМ). Дорсальный аргиром «одионочного» типа, дорсум гладкий, 8–9 дорсальных кинет (ДК). На вентральной стороне клетки расположены 10 фронтонентральных (ФЦ), 5 трансверсальных (ТЦ) и 3–5 каудальных (КЦ) (1–2 маргинальные) цирр. Цитоплазма бесцветная и прозрачная. Сократительная вакуоль (СВ) крупная и одионочная. Макронуклеус (Ма) С-образный. Микронуклеус (Ми) округлый, одионочный или двойной, лежит рядом или в углублении Ма. *E. japonicum* был собран с макрофитов в Японском море (залив Петра Великого) в июле 2021 года.

Филогенетический анализ. На филогенетическом древе *Euplotes*, построенном на основе гена 18s рРНК, *E. japonicum* с высокой степенью достоверности (ML-97, BI-1.00) формирует кладу с *E. crassus* (Dujardin, 1841) Kahl, 1932; *E. vannus* (Muller, 1786) Minkjewicz 1901; *E. cristatus* Kahl, 1932; *E. minuta* Yocum, 1930.

Сравнительный морфологический анализ. Как отмечалось ранее, рисунок дорсального аргирома является важным диагностическим признаком для видовой ревизии *Euplotes*. *E. japonicum* а также все его близкородственные виды, имеют схожий тип дорсального аргирома («одионочный» тип), что соответствует филогенетическому построению. Однако, все обозначенные выше виды имеют существенные морфологические различия с *E. japonicum*. Так, *E. japonicum* отличается от *E. crassus* числом ДК (8-9 vs 10) и числом дикинетид в центральной кинете (17-21 vs 26). Также *E. crassus* имеет 8 дорсальных гребней. *E. japonicum* отличается от *E. vannus* несколько меньшими размерами тела (94x47 мкм vs 103×60 мкм), меньшим числом мембранелл в адоральной зоне (41-52 vs 57-74) и количеством КЦ (3-5 vs 4-7). Различия с *E. cristatus* заклю-

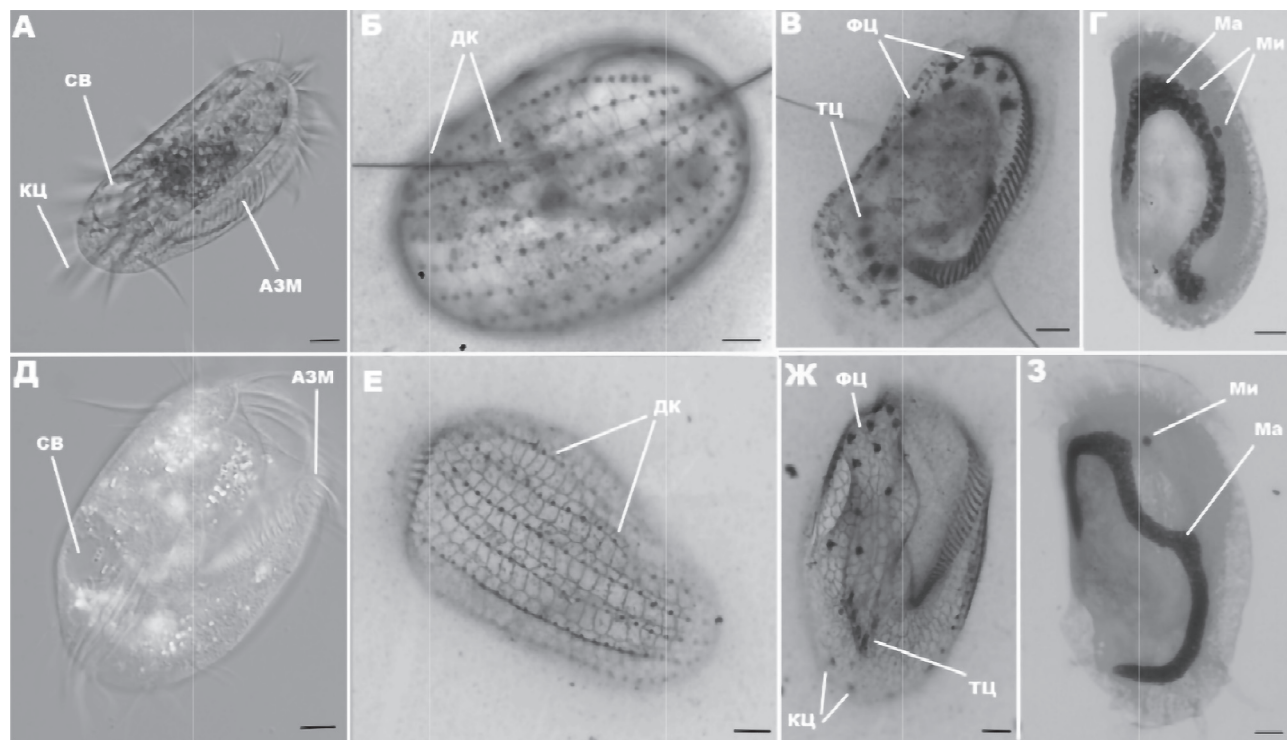


Рис. *E. japonicum* (А-Г) и *E. aediculatus* (Д-З)

чаются в следующем: размеры тела (94-47 мкм vs 60-45 мкм), количеством КЦ (3-5 vs 3) и числом дикинетид в центральной кинете (17-21 vs 11-15). *E. japonicum* отличается от *E. minuta* размерами клеток (94x47 мкм vs 54x28 мкм), числом мембранелл в адоральной зоне (41-52 vs 30-40), количеством дикинетид в центральной кинете (17-21 vs 12-13).

Euplotes aediculatus Pierson, 1943 (рис. Д-3)

Морфологическое описание. Средний размер клеток – 110×67.5 мкм. Форма тела овальная с плавно закругленными краями. Адоральная зона несет от 31 до 47 мембранелл. Дорсальный аргиром «двойного» типа, 6-7 ДК, 16-21 дикинетид в центральной кинете, дорсум гладкий. На вентральной стороне 9 ФЦ, 5 ТЦ и 1-3 КЦ. Кроме того, на вентре находятся 3 гребня, тянущихся по всей длине тела. Цитоплазма прозрачная. Ма типичной для эуплотид С-образной формы. Ми сферический, одиночный. СВ крупная. *E. aediculatus* был изолирован из безымянного пруда в Ленинградской области (дер. Высокая Грива, Лужский район, Санкт-Петербург).

Филогенетический анализ. Проведенный филогенетический анализ на основе маркерного гена 18s рРНК группирует *E. aediculatus* с другими штаммами данного вида (ML-100, VI-1.00). Сходство нуклеотидных последовательностей при этом составляет 99.87%.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 122031100281-5 (Зоологический институт РАН).

Сравнение физико-химических и биохимических свойств N-ацетилтрансфераз RimL из разных микроорганизмов

Трунилина М.В.^{1,2}, Болдаевский И.С.^{1,2}, Быков В.В.^{1,2}, Вологжанникова А.А.¹,
Шевелева М.П.¹, Кудряшов Т.А.¹, Соколов А.С.¹, Локтюшов Е.В.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН)

² Пушинский филиал РОСБИОТЕХ
masha.trunilina@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38790

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза, N-концевое ацетилирование, *Thermus thermophilus*, *Escherichia coli*.

N-концевое ацетилирование белков (НТА) – посттрансляционная модификация, при которой происходит перенос ацетильной группы от Ацетил-КоА на Nα-концевую аминогруппу белка [1]. Отсутствие НТА у рекомбинантных белков эукариот, например парвальбуминов, нарабатываемых в бактериях, критично сказывается на их структуре и функциональной активности [2].

Ранее нами была использована N-ацетилтрансфераза (NAT) RimL из *E. coli* для ацетилирования *in vitro* парвальбуминов, но добиться полного ацетилирования не удалось из-за его жесткой 3D структуры. Поэтому было решено проводить ацетилирование в нестандартных условиях: при высоких температурах и в присутствии денатурирующих агентов.

Учитывая важность ацетилирования для парвальбуминов и других белков, актуален поиск сверхстабильных ацетилтрансфераз. В этой связи, целью работы является изучение N-ацетилтрансферазы RimL из *Thermus thermophilus*.

NAT RimL *E. coli* (UniProt ID: P13857) и *T. thermophilus* (UniProt ID: Q5SHD1) (ВКМ В-1605) клонированы в вектор рЕТ-29. Сверхэкспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищены при помощи афинной хроматографии на Ni-НТА. Изучены их физико-химические свойства и функциональная активность.

Методом множественного выравнивания был проведен протеомный анализ ортологов RimL. Методом собственной флуоресценции белка изучена сравнительная характеристика по устойчивости NAT к pH, высоким температурам и денатурирующим агентам. Было показано, что Tth-RimL термостабильнее Ec-RimL приблизительно на 40 °С. Tth-RimL и Ec-RimL проявляют специфическую ацетилтрансферазную активность в отношении крысиного парвальбумина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478.

Литература

1. Miao L., et al. Studies of the in vitro Nalpha-acetyltransferase activities of E. coli RimL protein. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 357(3): p. 641–7.
2. Permyakov S.E., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin. Cell Calcium, 2012. 52(5): p. 366–76.

Создание штамма *Pseudomonas putida* BS3701 с мутацией гена, кодирующего регулятор FNR семейства

Фролова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН)
ali.frolowa@yandex.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38791

Ключевые слова: регуляция транскрипции, фактор транскрипции, *Pseudomonas putida* BS3701, Anr.

Нестабильность окружающей среды, а зачастую и нехватка ресурсов, вынуждают бактерии быстро реагировать на изменения путем активации альтернативных метаболических путей. Семейство белков-регуляторов восстановления фумарата-нитрата (FNR) осуществляют регуляцию экспрессии генов-мишеней, при недостатке кислорода это приводит к переключению с аэробного метаболизма на анаэробный.

Наиболее изученным представителем этого семейства является FNR из *Escherichia coli*. Некоторые бактерии, например, *Pseudomonas putida* и *Burkholderia spp.* обладают несколькими белками семейства FNR, каждый из которых имеет характерный кластер остатков цистеина в N-концевом домене. В штамме *P. putida* KT2440 обнаружены три белка семейства FNR с разной чувствительностью к кислороду: PP_4265 – белок Anr (название гена *fnrA*), PP_3233 – название белка в литературе отсутствует (название гена *fnrB*), PP_3287 – название белка в литературе отсутствует (название гена *fnrC*). Поскольку в настоящий момент нет устоявшихся названий для указанных выше генов и связанных с ними белков, далее мы будем называть ортолог гена FNR в *P. putida* KT2440 *anrA*, а не *fnrA*, а продукт гена AnrA, а не Anr. Два других гомолога мы будем называть *anrB*, а не *fnrB* (PP_3233, продукт гена AnrB) и *anrC*, а не *fnrC* (PP_3287, продукт гена AnrC). По сравнению с белком FNR *E. coli*, AnrA идентичен на 53%, покрытие 92%; AnrB идентичен на 46%, покрытие 92%; а AnrC идентичен на 41%, покрытие 84%. Все регуляторы имеют четыре консервативных остатка цистеина [1].

P. putida BS3701 также содержит три белка семейства FNR: H0H12_20955 – белок AnrA, H0H12_14865 – белок AnrB, H0H12_14815 – белок AnrC. Они являются ортологами белков семейства FNR из *P. putida* KT2440, и также белок AnrA ортолог FNR из *E. coli* (по данным сервиса SyntTax). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков семейства FNR из *P. putida* KT2440 и *P. putida* BS3701 показало высокую идентичность: AnrA идентичны на 100%, покрытие 100%; AnrB идентичны на 93,87%, покрытие 100%; AnrC идентичны на 96,98%, покрытие 97%. Консервативные остатки цистеина также присутствуют.

Штамм *P. putida* BS3701 содержит гены, кодирующие ключевые ферменты катаболизма нафталина: нафталин 1,2-диоксигеназу, салицилатгидроксилазу, катехол 2,3-диоксигеназу и катехол 1,2-диоксигеназу. Для эффективной работы ферментов этого метаболического пути необходим кислород. Ранее было установлено, что при снижении концентрации кислорода количество мРНК катаболических генов снижается. Для того, чтобы оценить участие транскрипционных факторов Anr в регуляции экспрессии генов диоксигеназ, был сконструирован мутантный штамм *P. putida* BS3701 с делецией гена *anrB*. Штамм получен методом направленного мутагенеза путем гомологичной рекомбинации. На основе суицидального вектора pJQ200KS были получены рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагмент ДНК с делеционным вариантом *anrB* (отсутствует последовательность ДНК, кодирующая 2-235 а.о. AnrB), фланкированный областями upstream и downstream *anrB* размером около 500 п.н. Плазмиду вводили в клетки *P. putida* BS3701 методом конъюгации с отбором меродиплоидов по устойчивости к гентамицину. Плазмиды pJQ200KS содержат ген левансахаразы *sacB*, этот фермент катализирует образование токсичного для клеток левана. Однако, при культивировании бактерий рода *Pseudomonas* на среде с сахарозой при 28 °С леван не образуется, предположительно из-за ферментации сахарозы. Была подобрана пониженная температура культивирования 5 °С, при которой проводили отбор продуктов двойного кроссинговера на среде с сахарозой. В результате были отобраны клоны Suc^RGm^S, в которых произошел двойной обмен между мутантным и диким аллелями целевого гена. Наличие делеции гена *anrB* подтверждали методом ПЦР, отсутствие точечных мутаций, которые могли бы затронуть генное окружение, подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

В дальнейшем планируется культивирование мутантного и дикого типа штаммов *P. putida* BS3701 в аэробных и микроаэрофильных условиях. Это позволит оценить входят ли гены, кодирующие ферменты катаболизма нафталина, в регулон транскрипционного фактора AnrB.

Литература

1. Ibrahim S.A., Crack J.C., Rolfe M.D., Borrero-de Acuña J.M., Thomson A.J., Le Brun N.E., Schobert M., Stapleton M.R., Green J. Three *Pseudomonas putida* FNR Family Proteins with Different Sensitivities to O₂. // J Biol Chem. 2015. 290(27):16812-16823. doi: 10.1074/jbc.M115.654079.

Потенциал ассоциации бактерий *P. yeii* и дрожжей *S. cerevisiae* для экспресс-оценки токсичности водных сред

Харькова А.С., Титова А.С.

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
(Естественнонаучный институт, кафедра «Химия»)
Anyuta_Zaytseva@mal.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38792

Ключевые слова: биосенсор, токсичность, медиатор, бактерии *Paracoccus yeii*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

В работе рассмотрен подход формирования рецепторных элементов для быстрой диагностики состояния поверхностных вод по индексу токсичности. Сформированы ассоциации микроорганизмов на основе бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173. Устойчивость состава сформированных ассоциаций определяли по изменению соотношения количества клеток ассоциаций высевам на твердые среды методом Коха в условиях эксплуатации рецепторных элементов. Модельный раствор токсиканта содержал ионы Cu²⁺. Соотношение микроорганизмов не изменяется в течение 4-х суток. Изменение состава ассоциации в конце периода измерений, может быть связано с тем, что бактерии *P. yeii* становятся

доминирующим видом, что может быть связано с более высокой устойчивостью к действию модельного токсиканта.

Биосенсор на основе указанной ассоциации включает заполненную буферным раствором ячейку, магнитную мешалку и два электрода: хлоридсеребряный электрод сравнения и модифицированный ферроценом графито-пастовый электрод с иммобилизованными микроорганизмами. Для регистрации аналитического сигнала использовали электрохимический преобразователь-потенциостат – IPS Micro. Измерения проводили при постоянном потенциале +250 мВ. После установления стабильного уровня тока в ячейку микропипеткой вводили аликвоту анализируемого раствора глюкозы, фиксируя амплитуду силы тока. Аналогично в ячейку вносили аликвоту раствора, содержащего модельный токсикант и глюкозу. Снижение скорости окисления глюкозы как амплитуды силы тока связано с воздействием токсиканта на метаболическую активность микроорганизмов. Аналитическим сигналом являлся индекс ингибирования, оцениваемый как степень снижения метаболической активности до и после введения токсиканта.

Биосенсор имеет хороший аналитический потенциал: долговременная стабильность биоэлектрода на основе ассоциации микроорганизмов составляет 5 суток, относительное стандартное отклонение аналитического сигнала при 14 последовательных измерениях – 7%, а воспроизводимость аналитического сигнала разных серий электродов – 5,6%. Чувствительность к фенолу, ионам меди и кадмия оценивали по значению концентрации токсиканта, вызывающую снижение активности рецепторного элемента на 50%. Для указанных соединений концентрации составили – 1,6; 15,9 и 15,6 мг/дм³, соответственно. Рецепторные элементы на основе ассоциаций не уступают по чувствительности рецепторным элементам на основе индивидуальных микроорганизмов, из которых составлена ассоциация: при совместном использовании микроорганизмов в составе ассоциации существенно увеличивается чувствительностью к раствору фенола. Биосенсор апробирован на трех пробах природной воды, результаты, полученные экспресс-методом имеют высокую корреляцию с результатами стандартных методов биотестирования.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, номер гранта № МК-4815.2022.1.4.

Физико-химические и микробиологические показатели качества кефира

Хоботова А.А., Зубко Е.В.

УО «Гродненский государственный университет им. Янки Купалы»
Alenka_Chobotowa@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38793

Ключевые слова: кефир, функциональный продукт, кефирные грибки, физико-химические и микробиологические показатели качества

Кефир – кисломолочный напиток, получаемый из цельного или обезжиренного коровьего молока путём кисломолочного и спиртового брожения с применением кефирных «грибков», состоящих из молочнокислых стрептококков и палочек, уксуснокислых бактерий и дрожжей.

Кисломолочные продукты являются необходимыми компонентами полноценного здорового питания. Они легко перевариваются, стимулируют секрецию пищеварительных желез, нормализуют моторную функцию кишечника и подавляют в нём гнилостную микрофлору. А также являются оптимальным сырьем для создания продуктов функционального питания.

Продукты функционального питания – это особая группа, которая не относится к категории лекарственных препаратов и лечебной пищи, хотя и используется для улучшения функционирования систем организма и повышения качества здоровья человека.

Среди продуктов функционального питания выделяют:

- Натуральные пищевые продукты, которые от природы содержат большое количество функционального ингредиента;
- Традиционные пищевые продукты, в которых технологически уменьшается количество вредных для здоровья компонентов;
- Пищевые продукты, дополнительно обогащённые функциональными ингредиентами.

Кефир является продуктом, который от природы содержит большое количество функционального ингредиента. В состав кефира входят такие витамины как витамин С, А, витамины группы В, никотиновая кислота. Кефир богат минералами калий, кальций, натрий, магний, фосфор. Помимо витаминов и минералов в кефире есть пробиотические микроорганизмы, которые улучшают состав кишечной микрофлоры и обменные процессы в организме (создают физиологическую кислую реакцию в кишечнике и подавляют развитие посторонней микрофлоры), а также облегчают переваривание пищи. Кефир усваивается организмом легче и быстрее, чем молоко (это связано с меньшей затратой пищеварительных соков на свертывание молока и уже произошедшим частичным протеолизом).

Усовершенствование производства кефира не стоит на месте. Производители начали улучшать и без того полезный обычный кефир, добавляя в него дополнительные заквасочные препараты, а именно – бифидобактерии. Такой напиток называется биокефиром или бифидокефиром. Известно, что наряду с представителями нормальной микрофлоры функциональными ингредиентами также являются пищевые волокна. Источниками пищевых волокон являются злаковые культуры, измельчённые пшеничные отруби, порошок яблочных выжимок. Также кефир дополнительно обогащают йодом, селеном, кальцием, лактулозой. Многие производители добавляют в кефир фруктово-ягодные наполнители или дополнительно обогащают витаминами С, А и Е.

Кефир – единственный кисломолочный напиток, вырабатываемый в промышленности на естественной симбиотической закваске – грибах. Кефирные грибки – прочное симбиотическое образование. Они имеют всегда определенную структуру и передают свои свойства и структуру последующим поколениям. Они имеют неправильную форму, сильноскладчатую или бугристую поверхность, консистенция упругая, мягко-хрящеватая, размеры от 1–2 мм до 3–6 см и более.

Микробиологический состав кефирного грибка весьма сложен. Он включает микроорганизмы трёх физиологических групп:

- Молочнокислые бактерии, осуществляющие гомо- и гетероферментативное брожение (мезофильные молочнокислые стрептококки видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*; ароматобразующие бактерии видов *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc dextranicum*; молочнокислые палочки рода *Lactobacillus*);
- Дрожжи, осуществляющие спиртовое брожение (*Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragilis*, *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis*);
- Уксуснокислые бактерии играют важную роль в симбиозе организмов кефирного грибка и формировании биологических свойств кефира (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter orientalis*).

Целью работы было провести анализ органолептических, физико-химических и микробиологических показателей качества кефира.

Для проведения исследования был куплен кефир «Савушкин» 2.5% производителя ОАО «Савушкин продукт» (РБ, г. Брест). Образец кефира исследуем по трем показателям:

1. Органолептическая оценка.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Органолептические показатели кефира

Название	Внешний вид и консистенция	Вкус и запах	Цвет
Кефир «Савушкин»	Консистенция однородная с нарушенным сгустком, с незначительным газообразованием	Чистый, кисломолочный, освежающий, слегка острый, без посторонних привкусов и запахов	Молочно-белый, равномерный по всей массе

2. Физико-химические показатели качества.

Результаты представлены в табл. 2.

Физико-химические показатели кефира

Наименование показателя	Требования СТБ 970-2017	Кефир «Савушкин»
Масса на упаковке, г	–	950
Фактическая масса, г	–	950
Кислотность, Т	85–130	120
Проба на пероксидазу	Не допускается	Не обнаружено
Массовая доля жира, %	2,5 (указана на упаковке)	2,5

3. Микробиологическим показатели качества:

- 1) количество молочнокислых организмов (МКО);
- 2) определения наличия бактерий группы кишечной палочки (БГКП);
- 3) определение бактерий рода *Salmonella*.

Микроскопическое исследование кефира показало, что в препаратах преобладали округлые мелкие клетки лактококков и термофильных стрептококков, обнаружены палочковидные клетки лактобактерий и небольшое количество уксуснокислых бактерий, встречались единичные скопления дрожжей круглой и овальной формы. МКО находилось в пределах нормы и составило $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/см³.

БГКП не обнаружены, поскольку отсутствовали газообразование и изменение цвета среды. Бактерии рода *Salmonella* в 25 г продукта не обнаружены.

По результатам исследования можно сделать вывод, что образец кефира отвечает требованиям СТБ 970-2017, является стандартом и подлежит реализации без ограничений.

Влияние источника углерода на параметры роста и выход растворимого белка у *Saccharomyces cerevisiae* K-245

Чепурина А.А.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет
1378399@bsu.edu.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38794

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae* K-245, меласса, сахароза, глюкоза.

Свекловичный жом, меласса и фильтрационный осадок представляют собой основные отходы свеклосахарного производства. Меласса образуется в результате многоступенчатой кристаллизации сахарозы и является межкристалльным раствором, отделенным при центрифугировании утфеля последней ступени кристаллизации. В результате этого меласса представляет собой сиропообразную вязкую непрозрачную темно-бурую жидкость со специфическим запахом. Выход данного вида отходов на производстве может колебаться в пределах от 3,0 до 5,5% от массы свеклы, подвергнутой переработке (Славянский, 2022).

Дальнейшее выделение сахара из мелассы является невыгодным с экономической точки зрения, поскольку оставшийся углевод входит в состав комплексных соединений, например, с калием и натрием (Бугаенко, 2007). Однако меласса характеризуется богатым составом и включает в себя широкий спектр различных классов химических веществ, поэтому особую роль играют пути ее эффективного вторичного использования. Самым оптимальным способом переработки является применение мелассы в качестве питательного субстрата. Данный подход позволяет сравнительно просто получать из отхода производства с помощью микробного синтеза необходимые целевые продукты.

Целью работы стало исследование особенностей роста клеток *Saccharomyces cerevisiae* К-245 на питательной среде, содержащей в качестве ростового субстрата свежковичную мелассу в различных концентрациях, а также количественное определение выхода растворимого белка в сравнении с соответствующими значениями, полученными при выращивании штамма в питательных средах, содержащих в качестве источника углерода сахарозу и глюкозу.

Характер роста *S. cerevisiae* К-245 отличается в зависимости от вида используемого источника углерода. В питательной среде, содержащей 4% сахарозы, 4% глюкозы и 2% мелассы культура входит в фазу стационарного роста на 16 час культивирования. При выращивании штамма в питательной среде, содержащей 4% мелассы, стационарная фаза роста культуры наступает позднее в сравнении с остальными вариантами субстрата и начинается на 20-ый час культивирования.

По полученным кривым роста были посчитаны значения удельной скорости роста, времени удвоения биомассы, а также среднего прироста за время логарифмической фазы.

Таблица 1

Значения удельной скорости роста (μ), времени удвоения биомассы (g) и среднего прироста (X) *S. cerevisiae* К-245 на различных источниках углерода

	μ , ОЕ/ч	g, ч	X, %
4% сахароза	0,659±0,012	1,051±0,019	82,7
4% глюкоза	0,746±0,011	0,929±0,023	98,7
2% меласса	0,396±0,006	1,752±0,025	102,5
4% меласса	0,485±0,004	1,731±0,0187	97,1

В ходе определения концентрации растворенного белка было выявлено, что его наибольшее количество синтезируется клетками *S. cerevisiae* К-245 при культивировании в питательной среде, содержащей в качестве источника углерода 4% мелассы. При выращивании данных дрожжей на 2% мелассы растворимого белка образуется на 11% меньше. В результате выращивания *S. cerevisiae* К-245 в питательной среде, содержащей 4% глюкозы и 4% сахарозы концентрация растворимого белка оказались ниже максимального значения на 60% и 53% соответственно.

Наибольший выход растворимого белка при культивировании на мелассе, в сравнении с моноуглеводными средами, может быть объяснен тем, что меласса, помимо углеводов, содержит в своем составе витамины, органические кислоты, оказывающие стимулирующее действие на процессы биосинтеза в клетках дрожжей

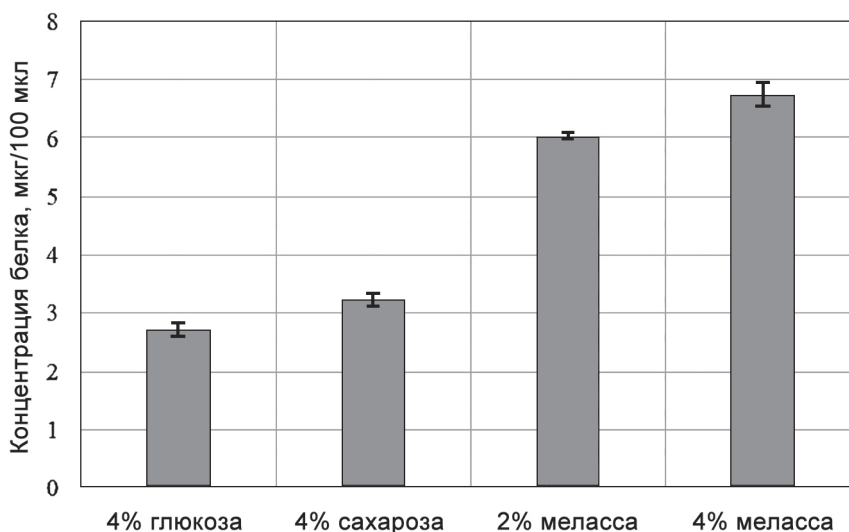


Рис. 1. Концентрация растворенного белка в образцах дрожжей *S. cerevisiae* К-245, выращенных на различных источниках углерода

S. cerevisiae K-245. Однако в мелассе также содержится небольшое количество примесей, негативно влияющих на клетки, в связи с чем с повышением концентрации мелассы наблюдается уменьшение скорости роста и деления клеток.

Литература

1. Бугаенко И.Ф. Общая технология отрасли: Научные основы технологии сахара: Учебник для студентов вузов / И.Ф. Бугаенко, В.И. Тужилкин. Ч. 1. СПб.: ГИОРД, 2007. 512 с.
2. Славянский А.А. и др. Основные отходы сахарного производства и их использование // Сахар. 2022. № 12. С. 30–37.

Распространение и фенотипическое проявление гена *mprF* среди коагулазонегативных стафилококков

Ябурова Е.В., Кононова Л.И., Полюдова Т.В.

ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов»
yaburova_k@mail.ru

DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38795

Ключевые слова: ген *mprF*, катионные антибактериальные пептиды, коагулазонегативные стафилококки, лизилфосфатидилглицерин, лизилфосфатидилглицерин флиппаза/синтаза.

В естественных условиях бактерии часто сталкиваются с действием катионных антибактериальных пептидов (АБП), которые производятся иммунной системой хозяина (дефензины, кателицидины) или другими микроорганизмами (бактериоцины) [2]. Одним из способов защиты бактерий с АБП является снижение общего отрицательного заряда на поверхности клетки посредством присоединения остатков L-лизина к фосфолипидам мембран, в частности к фосфатидилглицерину (ФГ). Реакция катализируется ферментом лизилфосфатидилглицерин флиппаза/синтазой, кодируемой геном *mprF*. Фермент MprF – это бифункциональный мембранный белок, имеющий синтазную и транслоказную активность [1]. На сегодняшний день более половины всех исследований гена *mprF* проведено на бактериях *S. aureus*. Тогда как, изучение MprF и его гена, у коагулазонегативных стафилококков (КНС), практически не проводилось.

Целью работы был анализ секвенированных геномов КНС доступных в базе данных National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) на наличие в них гена *mprF*, а также выявление лизилфосфатидилглицерина (лизилФГ) среди фосфолипидов бактерий *S. aureus* ATCC 25923 и *S. cohnii* ВКМ-3165.

На сегодняшний день известно 72 вида бактерий рода *Staphylococcus*, из них к КНС относятся 65. В базе данных NCBI депонировано 42 вида КНС с полногеномным секвенированием (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, дата обращения 15.10.2023). Биоинформатический поиск геномов на наличие в них гена *mprF* показал, что он обнаружен у 40 видов КНС (95%). Исключением явились бактерии *S. casei* DSM 15096 (референсный геном ASM3029440v1), у которых обнаружен вариант гена *mprF* – аннотированный в базе данных как псевдоген со сдвигом рамки считывания, не кодирующий белок. А также бактерии *S. felis*, у которых ген *mprF* не обнаружен совсем, что может быть связано с его утратой в ходе эволюции [3]. В базе NCBI для штамма *S. aureus* ATCC 25923 депонирован полный сиквенс (ASM2859624v1) и отмечено наличие гена *mprF*. Для *S. cohnii* ВКМ-3165 полногеномного секвенирования не проводилось, однако в геномах, представленных в базе NCBI для вида *S. cohnii*, ген *mprF* присутствует. Методом тонкослойной хроматографии было проведено выявление его продукта – лизилФГ у бактерий *S. aureus* ATCC 25923 и *S. cohnii* ВКМ-3165. Идентификацию липидов проводили путем сравнения их подвижности с подвижностью образцов чистых липидов (Sigma, США), а также с помощью специфической окраски хроматограмм [4]. Результаты качественного состава ли-

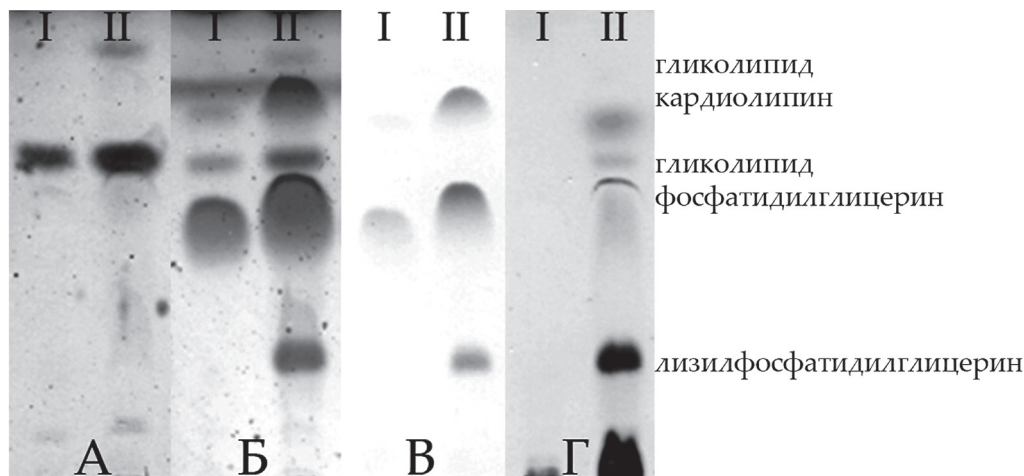


Рис. 1. Одномерная хроматограмма полярных липидов *S. cohnii* ВКМ-3165 (I) и *S. aureus* ATCC 25923 (II). Специфическая окраска: А – гликолипиды, Б – общие липиды, В – фосфолипиды, Г – аминокислотосодержащие липиды

пидов изученных стафилококков, представлены на рис. 1. Среди липидов обоих стафилококков обнаружены гликолипиды, кардиолипин, фосфатидилглицерин. У бактерий *S. aureus* ATCC 25923 выявлен лизилФГ, тогда как у *S. cohnii* ВКМ-3165 данный фосфолипид отсутствует.

Анализ чувствительности бактерий к катионным АБП варнерину и протамину показал, что наибольшей резистентностью к ним обладали бактерии *S. aureus* ATCC 25923, для которых минимальные ингибирующие концентрации (МИК) составляли 512 и 387 мкг/мл соответственно. В то же время МИК варнерина и протамин для *S. cohnii* ВКМ-3165 составляли 0,25 и 3 мкг/мл соответственно. Высокая чувствительность *S. cohnii* ВКМ-3165 к катионным АБП может быть обусловлена отсутствием лизилФГ в составе мембран. Выявленный факт может свидетельствовать либо об отсутствии или повреждении гена *mprF*, либо об ингибировании его экспрессии.

Таким образом, согласно полученным данным, механизм резистентности КНС к катионным соединениям, обусловленный работой гена *mprF*, является широко распространенным явлением. Однако фенотипическое проявление работы данного гена может быть выявлено не у всех представителей рода *Staphylococcus*. С целью поиска способов преодоления подобного механизма устойчивости бактерий необходимо изучение факторов, влияющих на уровень экспрессии гена *mprF* у КНС.

Литература

1. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль гомо- и гетеромутаций. Гостев В.В., Сопова Ю.В., Калиногорская О.С., Цветкова И.А., Сидоренко С.В. // Генетика. 2020. Т. 56, N 3. С. 282291 doi: 10.31857/S0016675820030066
2. Peschel A., Jack R.W., Otto M., et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine // The Journal of experimental medicine. 2001. Vol. 193(9). P. 1067–1076. doi:10.1084/jem.193.9.1067
3. Lerat E., Ochman H. Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes // Nucleic acids research. 2005. Vol. 33(10). P. 3125–3132. doi: 10.1093/nar/gki631
4. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. М.: Мир, 1975. 322 с.

Научное издание

**III ПУЩИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ
«ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ
В МИКРОБИОЛОГИИ, МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ»**

**(в рамках IX Пущинской конференции
«Биохимия, физиология и биосферная роль
микроорганизмов»)**

5–7 декабря 2023 г.

Сборник материалов конференции

Подписано к печати 00.11.2023
Формат 62×94/8. Печать офсетная.
Бумага офсетная, 80 г/м². Уч.-изд. 00 п.л. Тираж 00 экз.

ООО «Издательство ГЕОС»
125315, 1-й Амбулаторный пр., 7/3–114
Тел./факс: (495) 959-35-16, (499) 152-19-14, 8 926-222-30-91.
E-mail: geos-books@yandex.ru, www.geos-books.ru

Отпечатано с готового оригинал-макета в ОАО «Альянс «Югполиграфиздат»»
ООО «Т-Пресс» 400001, г. Волгоград, ул. КИМ, 6